

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**ESTIMULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS CANALES DE POTASIO
ACTIVADOS POR CALCIO (K_{Ca}) COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN
LA DISFUNCIÓN ERÉCTIL DIABÉTICA Y LA HIPERACTIVIDAD VESICAL**

Tesis Doctoral

Rocío González Corrochano

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**ESTIMULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS CANALES DE POTASIO
ACTIVADOS POR CALCIO (K_{Ca}) COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN
LA DISFUNCIÓN ERÉCTIL DIABÉTICA Y LA HIPERACTIVIDAD VESICAL**

Memoria que para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

ROCÍO GONZÁLEZ CORROCHANO

Director

Dr. Javier Angulo Frutos

Departamento de Investigación, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria

MADRID, 2016

Cien veces al día me recuerdo que mi vida interna y externa depende del trabajo de otros hombres, vivos y muertos, y que he de esforzarme para dar en la misma medida que he recibido y que sigo recibiendo

ALBERT EINSTEIN (1879-1955)

PREMIO NOBEL DE FÍSICA

“Este mundo, a pesar de toda nuestra ciencia y ciencias, sigue siendo un milagro; maravilloso, inescrutable, mágico, y más de lo que nadie se puede imaginar”

THOMAS CARLYLE (1795-1881)

ESCRITOR E HISTORIADOR

Dedicado a vosotros,
Eusebio y Pilar,
las dos personas que me dieron la vida y que con su sacrificio y esfuerzo han
hecho que mi sueño se hiciese realidad.
Gracias por todo.
Os quiere,
vuestra hija.

- Índice -

ABREVIATURAS

RESUMEN

SUMMARY

INTRODUCCIÓN	1
Anatomía funcional del pene	3
Control neurovascular de la erección	4
Fisiología de la función eréctil	5
Papel del óxido nítrico y la vía del GMP _c	6
La vía del AMP _c	8
Hiperpolarización de la célula muscular lisa	9
Fosfodiesterasas	12
Canales de potasio activados por K_{Ca} en tejido eréctil humano	13
Clasificación y características de los canales de potasio	14
Canales de potasio activados por calcio (K _{Ca})	15
Farmacología de los canales K _{Ca}	18
Canales K _{Ca} en tejido eréctil humano	19
Disfunción eréctil	21
Aspectos epidemiológicos de la DE	22
Hipertensión arterial (HTA)	23

Hiperlipidemia	23
Tabaquismo	24
Diabetes Mellitus (DM)	24
Disfunción eréctil asociada a la diabetes mellitus (DEDM)	26
Fisiopatología de la disfunción eréctil diabética	27
Deterioro funcional	27
Profundo deterioro de la vía del NO/GMP _c	27
Incremento del stress oxidativo	28
Alteraciones de los mecanismos del músculo liso peneano.	30
Alteraciones estructurales	31
Alteraciones neuronales	32
Alteraciones hormonales	32
Anatomía de la vejiga urinaria	33
Fisiología de la actividad vesical	34
Fases de la micción	34
Fase de llenado y almacenamiento	34
Fase de vaciado	35
Inervación de la vejiga urinaria	35
Receptores implicados en el control de la vejiga urinaria	36
Receptores muscarínicos	36
Receptores adrenérgicos	36
Canales iónicos en la vejiga. Papel de los canales K_{Ca}	39
Alteración de la función del tracto urinario	40
Alteraciones de la micción	40
Patologías del aparato urinario	40

Vejiga hiperactiva y síntoma urinarios del tracto Inferior (LUTS) asociados a hiperplasia benigna de próstata	41
Síndrome de vejiga hiperactiva (SVH)	41
LUTS asociados a la hiperplasia benigna de próstata (HBP)	43
Disfunción eréctil asociada a LUTS	43
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	51
Métodos	53
Tejido de pene humano	53
Reactividad vascular de arterias de resistencia del pene humano	54
Experimentos en cuerpo cavernoso	56
Animales de experimentación	57
Modelo de diabetes	58
Determinación de las respuestas eréctiles a la estimulación eléctrica del nervio cavernoso en ratas anestesiadas	58
Histología	60
Fijación e inclusión en parafina	60

Técnicas de tinción para observaciones con microscopio óptico	60
Tinción histológica con Hematoxilina-Eosina de Harris	60
Tinción histológica con Tricrómico de Masson	61
Técnica inmunohistoquímica	61
 Determinación del contenido de GMP_C en cuerpo cavernoso humano	62
 Determinación de proteínas (Método de Lowry)	63
 Especímenes de vejiga humana	64
Estudios de contractilidad	64
 Cistometrías	65
 Reactivos y materiales	66
 Análisis estadísticos	67
 RESULTADOS	69
 Efectos de la modulación de los K_{Ca} sobre la relajación causada por la inhibición de la PDE5 en ARPH y CCH	71
La activación de los K_{Ca} causa relajación en ARPH y CCH	71
La modulación de los K_{Ca} influencia la capacidad relajadora de los inhibidores de la PDE5 en ARPH pero no en CCH	72
Dependencia del endotelio en el efecto inducido por la activación de los K_{Ca} en ARPH	74

Análisis de los subtipos de K_{Ca} que están implicados en el efecto producido por el NS-8	75
Expresión y distribución de los K_{Ca} en el endotelio y músculo liso tanto en las ARPH y en CCH como en tejido peneano de rata revelado por inmunohistoquímica	77
Efectos de la activación de los K_{Ca} y la inhibición de la PDE5 sobre las respuestas eréctiles <i>in vivo</i>	79
Efecto del sildenafil y los activadores de los K_{Ca} sobre la presión arterial sistémica en ratas	80
Efectos del sildenafil, un activador de los K_{Ca} y la combinación de ambos sobre las respuestas eréctiles <i>in vivo</i> en ratas	81
Impacto de la diabetes sobre la vía del NO/GMP _c en el tejido eréctil de pacientes con DE	83
Impacto de la diabetes sobre la relajación endotelial en CCH y ARPH de pacientes con DE	83
Impacto de la diabetes sobre la relajación neurogénica del CCH y de las ARPH	85
Impacto de la diabetes sobre las relajaciones mediadas por un donador de NO en CCH y en ARPH	86
Impacto de la diabetes sobre el contenido de GMP _c en el CCH	87
Efecto de la diabetes en la relajación inducida por el sildenafil en CCH y en las ARPH	88
La activación de los K_{Ca} revierte el deterioro causado por la diabetes sobre la vasodilatación de las ARPH inducida por el sildenafil	90
La activación de los K_{Ca} aumenta la eficacia de la inhibición de la PDE5 en recuperar la función eréctil en ratas diabéticas	91
Efectos de la modulación de los K_{Ca} sobre la contracción neurogénica de la vejiga humana y de rata	93
Influencia de la presencia de síntomas urinarios sobre los efectos de la modulación de los BK sobre las contracciones neurogénicas de la vejiga humana	98

Efectos de la modulación de los K_{Ca} sobre la contracción miogénica de la vejiga humana	100
Efectos de la activación de los BK sobre los parámetros cardiovasculares y la función urodinámica en ratas	102
Efectos de la activación de los BK sobre los parámetros urodinámicos en un modelo de vejiga hiperactiva en ratas	102
Expresión y distribución de los K_{Ca} en la vejiga humana y la vejiga de rata	104
DISCUSIÓN	105
Papel de la activación de los K_{Ca} en la recuperación de la capacidad relajadora de los inhibidores de la PDE5 en la DE diabética	107
Papel de la activación de los BK en el alivio de la hiperactividad vesical/LUTS	115
CONCLUSIONES	121
CONCLUSIONS	125
BIBLIOGRAFÍA	129

- Abreviaturas –

8-Br-GMP_C: 8-Bromo GMP_C
AA: ácido araquidónico
AC: adenilato ciclasa
ACh: acetilcolina
ADMA: dimetilarginina asimétrica
AGES: productos finales de la glicación
APA: apamina
ARPH: arterias de resistencia peneanas
AUC: área bajo la curva
β₂-ADR: receptor adrenérgico β₂
BK: K_{Ca} de gran conductancia
BSA: albúmina sérica bovina
CCH: cuerpo cavernoso
CCh: carbacol
CCR: Cuerpo cavernoso de rata
cGKI: proteína quinasa dependiente de GMP_C tipo I
cGKII: proteína quinasa dependiente de GMP_C tipo II
CTX: caribdotoxina
DE: disfunción eréctil
DEDM: disfunción eréctil asociada a la diabetes mellitus
DHT: dihidrotestosterona
DO: donantes de órganos
DM: diabetes mellitus
EDHF: factor hiperpolarizante derivado de endotelio
EE: error estándar
EENC: estimulación eléctrica del nervio cavernoso
EET: estimulación eléctrica transmural
eNOS: NOS endotelial

EP₂/EP₄-R: receptor prostanoide para la prostaglandina tipo E
ET: endotelio trabecular
ET-1: endotelina-1
EV: endotelio vascular
FRCV: factores de riesgo cardiovascular
GCs: guanilato ciclasa soluble
GLIB: glibenclamida
GMP_C: 3',5' monofosfato cíclico
GTP: guanosin-5'-trifosfato
Gs: proteína G estimuladora
HBP: hiperplasia benigna de próstata
HPβCD: hidroxipropil-β-ciclodextrina
HTA: hipertensión arterial
IbTx: iberiotoxina
ICS: international continence society
IIEF: índice internacional de función eréctil
iNOS: NOS inducible
IK: K_{Ca} de intermedia conductancia
IP₃: inositol trifosfato
K_{ATP}: canales de potasio sensibles a ATP
K_{Ca}: canales de potasio activados por calcio
K_{Co}: activadores de los K_{Ca}
KHS: Krebs Henseleit
KKHS: K+ Krebs Henseleit
K_V: canales de potasio dependientes de voltaje
LUTS: síntomas del tracto urinario inferior
MLCK: cadena ligera de la miosina
MLT: músculo liso trabecular
MLV: músculo liso vascular
NADPH: nicotinamidadenina dinucleótido fosfato
Na⁺/K⁺-ATPasa: bomba de sodio
NANC: no adrenérgico no colinérgico

NE: norepinefrina
NO: óxido nítrico
NOS: sintasa de NO
nNOS: NOS neuronal
OXIB: oxibutinina
PAM: presión arterial media
PBS: tampón fosfato
PDE5: fosfodiesterasa tipo 5
PFA: paraformaldehído
PE: fenilefrina
PGE: prostaglandina E
PGI₂: prostaciclina
PIC: presión intracavernosa
PIN: pinacidil
PIV: presión intravesical
PKA: proteína quinasa A
PKB: proteína quinasa B
PKC: proteína quinasa C
PKG: proteína quinasa dependiente de GMP_C
PLB: fosfolamban

PLC: fosfolipasa C
PnNOS: nNOS peneana
RAGEs: receptores específicos de los AGES
ROCK: Rho-quinasa
ROS: especies reactivas de oxígeno
RS: retículo sarcoplásmico
SHR: ratas espontáneamente hipertensas
SK: K_{Ca} de pequeña conductancia
SNC: sistema nervioso central
SOD: superóxido dismutasa
SVH: síndrome de vejiga hiperactiva
TEA: tetraetilamonio
TTx: tetrodotoxina
VH: vejiga hiperactiva
VIP: polipéptido intestinal vaso activo
VIP-R: receptor para el péptido intestinal vasoactivo

- Resúmen -

Los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) incrementan la actividad de la vía del NO/GMP_C y representan un tratamiento eficaz de la disfunción eréctil (DE) aunque su eficacia es significativamente más baja en pacientes diabéticos. Los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) se han identificado en tejido peneano humano y se ha propuesto su participación en la relajación inducida por la vía del NO/GMP_C. Además, estos canales se han identificado en vejiga urinaria y se les ha atribuido un papel importante en la excitabilidad y contractilidad del músculo liso de la vejiga urinaria.

Los objetivos generales del presente trabajo fueron: 1) evaluar el efecto de la activación de los K_{Ca} sobre la capacidad relajadora de los inhibidores de la PDE5 en tejido de pene humano, tanto en arterias de resistencia como en cuerpo cavernoso, y sobre la eficacia de la inhibición de la PDE5 para aumentar las respuestas eréctiles en un modelo de DE causada por la diabetes y, 2) analizar los efectos de la activación de los K_{Ca} sobre las contracciones neurogénicas y miogénicas de la vejiga humana de sujetos saludables y de pacientes con síntomas del tracto inferior urinarios (LUTS) y evaluar la eficacia de esta intervención farmacológica para revertir la hiperactivación de la vejiga en ratas.

La activación de los K_{Ca} de gran conductancia (BK) con NS-8 ó NS1619 potenció significativamente las relajaciones inducidas por los inhibidores de la PDE5, sildenafil y tadalafilo en las arterias de resistencia peneanas (ARPH) obtenidas de pacientes con DE y de donantes de órganos. De hecho, la adición de NS-8 revirtió el deterioro de la relajación a sildenafil en las ARPH de pacientes diabéticos. *In vivo*, la activación de los K_{Ca} combinada con la administración de sildenafil revirtió completamente la DE en las ratas diabéticas. Por otra parte, las contracciones neurogénicas inducidas por la estimulación eléctrica (EET) en tiras de vejiga obtenida de donantes de órganos y de pacientes con hiperplasia benigna de próstata (HBP) y síntomas urinarios fueron inhibidas por la estimulación de los BK con NS-8 ó NS1619, aunque este efecto inhibitorio fue más notable en la vejiga de pacientes con HBP. El NS-8 revirtió la hiperactividad de la vejiga inducida por el ácido acético en ratas.

La activación de los K_{Ca} mejora la capacidad vasodilatadora de los inhibidores de la PDE5 en las ARPH de pacientes diabéticos y, posibilita *in vivo* la recuperación de la función eréctil en ratas diabéticas en combinación con la inhibición de la PDE5. Por otro lado, la activación de los BK inhibe las contracciones neurogénicas de la vejiga de pacientes con síntomas urinarios y alivia la hiperactividad de la vejiga *in vivo* sin comprometer su capacidad contráctil y sin causar efectos cardiovasculares manifiestos. Estos resultados sugieren el potencial terapéutico de la activación de los BK en el tratamiento de la DE diabética y de la vejiga hiperactiva, dos situaciones patológicas que frecuentemente concurren en el hombre de edad avanzada.

- Summary -

PDE5 inhibitors enhance NO/cGMP pathway activity and represent an effective treatment of erectile dysfunction (ED) although its efficacy is significantly lower in diabetic patients. Calcium-activated potassium channels (K_{Ca}) have been identified in human penile tissue and have been proposed to participate in the relaxation induced by NO/cGMP signaling pathway. Furthermore, these channels have been identified in urinary bladder and have been suggested to play an important role in urinary bladder smooth muscle excitability and contractility.

The objectives of this study were: 1) to evaluate the influence of K_{Ca} activation on the ability of PDE5 inhibitors in human penile tissues, both penile resistance arteries and corpus cavernosum, and the effectiveness of PDE5 inhibition to increase erectile function in a model of ED caused by diabetes and 2) to analyse the effects of K_{Ca} activation on neurogenic and myogenic contraction of human bladder from healthy subjects and patients with lower urinary tract symptoms (LUTS) and to evaluate its efficacy in reversing bladder hyperactivity in rats.

Stimulation of large-conductance K_{Ca} (BK) with NS-8 or NS1619 significantly potentiated relaxation induced by PDE5 inhibitors, sildenafil and tadalafil in penile resistance arteries (HPRA) collected from patients with ED and organ donors. In fact, the addition of NS-8 recovered the impaired relaxation to sildenafil in diabetic HPRA. *In vivo*, activation of K_{Ca} combined with sildenafil completely reversed ED in diabetic rats. Moreover, ETS-induced neurogenic contractions were inhibited by BK activation with NS-8 or NS1619 in bladder strips obtained from organ donors and from men with benign prostatic hyperplasia (BPH), although this inhibitory effect was more marked in the bladder from BPH patients. NS-8 reversed bladder hyperactivity induced by acetic acid in rats.

Activation of K_{Ca} improves vasodilatory capacity of PDE5 inhibitors in HPRA from diabetic patients, resulting in the recovery of erectile function *in vivo* in diabetic rats in combination with PDE5 inhibition. Furthermore, BK stimulation inhibits neurogenic contractions of the bladder in patients with urinary symptoms and relieves overactive bladder *in vivo* without compromising bladder contractile capacity and without exerting manifest cardiovascular effects. These results suggest the potential therapeutic relevance of BK activation in the treatment of diabetic ED and overactive bladder, two pathological conditions that frequently coexist in elderly men.

- Introducción -

Anatomía funcional del pene

El pene es un órgano con dos funciones, urinaria y sexual. Está formado por tres estructuras cilíndricas compuestas de tejido eréctil y revestidas por la fascia de Buck: dos cuerpos cavernosos y un cuerpo esponjoso situado en la parte ventral. Éste envuelve a la uretra y se expande distalmente para formar el glande del pene. Los cuerpos cavernosos se inician en las ramas isquiopúbicas, con el bulbo esponjoso en el centro.

La túnica albugínea forma un recubrimiento fibroso para el tejido eréctil del cuerpo cavernoso y del cuerpo esponjoso. El interior de los cuerpos cavernosos y el cuerpo esponjoso están constituidos por tejido eréctil también conocido como tejido trabecular. El tejido cavernoso presenta el aspecto de una esponja con una red de espacios cavernosos conectados entre sí, los cuales también son denominados senos cavernosos, espacios lacunares o sinusoides.

Los espacios cavernosos se encuentran revestidos de endotelio vascular y están separados por trabéculas, que a su vez se componen de haces de fibras de músculo liso con una matriz extracelular formada por elastina y colágeno (fig. 1) (Anderson y col., 1995)

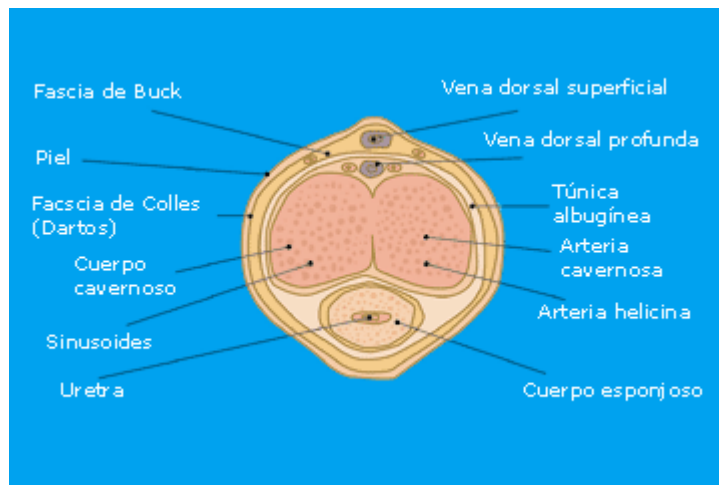


Fig. 1. Corte transversal del pene

Control neurovascular de la erección

La erección es una respuesta fisiológica en la que participan mecanismos neurovasculares y endocrinos. Las arterias cavernosas proporcionan sangre al cuerpo cavernoso del pene (a partir de la arteria pudenda) y las venas subtunicales corren a través de la túnica albugínea permitiendo el drenaje. Durante la erección, la relajación del músculo liso trabecular resulta en el incremento del flujo sanguíneo en el cuerpo cavernoso y una expansión de los sinusoides. Esta expansión causa una compresión mecánica de las venas subtunicales, la cual impide el drenaje de la sangre y por consiguiente el pene alcanza la fase de rigidez por el acúmulo de sangre en el mismo (fig. 2).

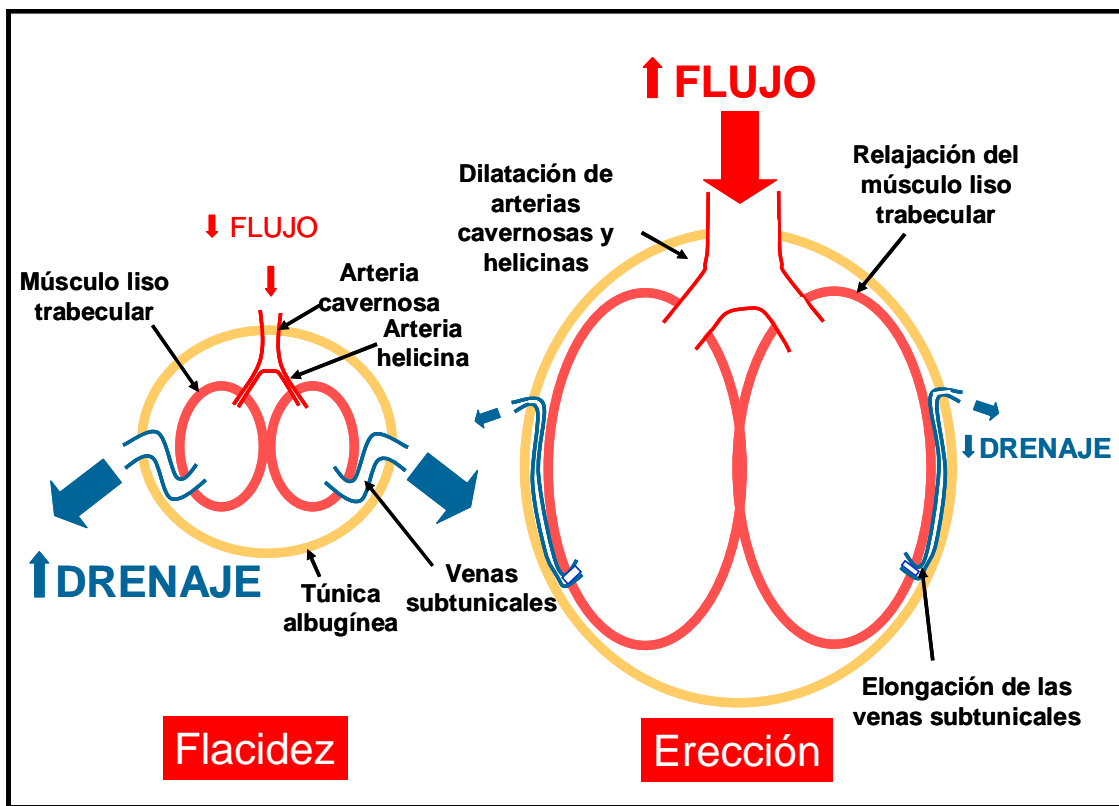


Fig. 2. Representación esquemática de las estructuras implicadas en la erección. A la izquierda el pene aparece en flacidez, estado en el que predomina el tono constrictor en el músculo arterial y trabecular. Esto condiciona un estado de bajo flujo y baja presión en los espacios lacunares. A la derecha se representa el pene en erección, con vasodilatación arterial (arterias cavernosa y helicinas) y relajación del músculo trabecular con expansión de los espacios lacunares y la túnica albugínea. Esto lleva a la elongación de las vénulas subtunicales con disminución de su calibre, que aumenta la resistencia al flujo de salida (mecanismo veno-oclusivo).

El flujo sanguíneo peneano está controlado por el sistema nervioso central y periférico. La erección, que se presenta como resultado de estímulos visuales, auditivos, táctiles y olfatorios así

Introducción

como por fantasías, es controlada por el Sistema Nervioso Central mediante núcleos localizados principalmente en el tálamo y en el área preóptica medial del hipotálamo rostral.

Los vasos sanguíneos, así como las fibras musculares intrínsecas del pene y la musculatura estriada regional, dependen de un doble control periférico: el simpático torácico-lumbar, localizado entre T12 y L2, el cual es responsable de la inervación simpática autónoma del pene, y el parasimpático lumbosacro localizado entre S2 y S4, el cual es responsable de la inervación parasimpática. Los axones parten de estos centros y se combinan para formar los plexos hipogástrico y pélvico, los que a su vez son responsables de la inervación de la vejiga, próstata y recto, además del pene (fig. 3). Los nervios cavernosos incorporan fibras nerviosas simpáticas y parasimpáticas que se originan en estos plexos. Desde el punto de vista anatómico, se encuentran localizados en la superficie postero-lateral de la próstata y cursan hacia el pene para inervar los cuerpos cavernosos, el cuerpo esponjoso y las arterias cavernosas. Estos nervios tienen terminaciones nitrérgicas que son responsables de la liberación local de óxido nítrico (NO) en el músculo liso trabecular.

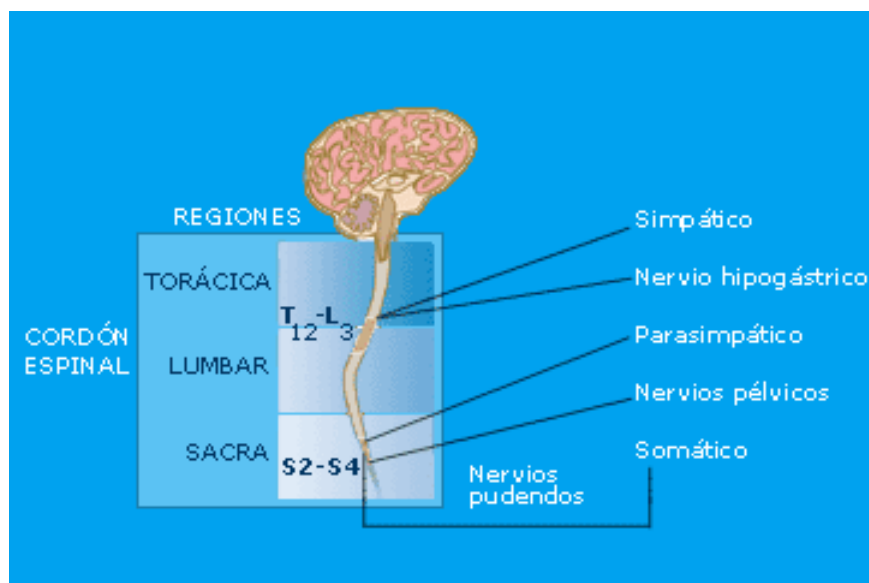


Fig. 3. Control neurogénico de la erección. El plexo pélvico es la vía neuronal fundamental en la generación de la erección.

Fisiología de la función eréctil

En respuesta a un estímulo central, las terminaciones nerviosas y el endotelio liberan sustancias que relajan el músculo liso del pene (arterial y cavernoso) este fenómeno produce la dilatación de las arterias (la arteria cavernosa y las arterias helicinas), aumentando el flujo sanguíneo y la perfusión a los espacios lacunares. Momentos después de la dilatación arterial se relaja el músculo liso cavernoso, lo que provoca la expansión de los espacios lacunares que, al presionar sobre la túnica

albugínea, producen la oclusión del sistema venoso, facilitando la acumulación de sangre en el pene y por tanto la erección (Simonsen y col., 2002; Saenz de Tejada y col., 2004; Saenz de Tejada y col., 2005). Para que tenga lugar la vasodilatación y relajación y, por tanto, una función eréctil adecuada, es necesario que la capacidad funcional tanto de las arterias como del cuerpo cavernoso esté completamente preservada (fig. 2).

Papel del NO y la vía del GMP_c

El óxido nítrico (NO) es una molécula sintetizada por varios tipos celulares diferentes que regula diversos procesos fisiológicos como la relajación del músculo liso, la actividad plaquetaria, la neurotransmisión central y periférica y las acciones citotóxicas de las células inmunes (Moncada y col., 1991; Moncada y col., 1995).

El enzima encargado de la síntesis de NO es la sintasa de NO (NOS), que utiliza la L-arginina como sustrato para producir NO y L-citrulina, con requerimiento de oxígeno, NADPH y tetrahidrobiopterina. Se han identificado tres isoformas de la NOS: dos constitutivas, la neuronal (nNOS; NOS I) y la endotelial (eNOS; NOS III), que se expresan en el sistema nervioso y las células endoteliales, respectivamente. Ambas isoformas requieren calcio-calmodulina para su actividad. La tercera isoforma (iNOS; NOS II) no es dependiente de calcio, es inducible y se puede expresar en una gran variedad de tejidos en respuesta a mediadores de la inflamación y productos bacterianos (Moncada y col., 1991; Moncada y col. 1995).

La nNOS se expresa en los nervios colinérgicos del pene y la eNOS se expresa en el endotelio vascular y trabecular de este órgano (Burnett y col., 1992; Burnett y col., 1993; Dail y col., 1995; Hedlund y col., 1999; Hedlund y col., 2000a; Stanarius y col., 2001). La iNOS sólo se detecta en el músculo liso urogenital tras la exposición del tejido peneano a estímulos inflamatorios (Cellek y col., 1997).

Los nervios parasimpáticos que contienen nNOS y liberan NO como un neurotransmisor junto a la acetilcolina, se denominan actualmente, nitrérgicos (Moncada y col., 1997; Hedlund y col., 1999). La estimulación del nervio cavernoso activa las fibras nerviosas nitrérgicas y provoca la liberación de NO por parte de éstas (Ignarro y col., 1990; Leone y col., 1994), causando la relajación del músculo liso. La inhibición de la síntesis de NO previene, *in vitro*, la relajación inducida por la estimulación de las terminaciones nitrérgicas en el cuerpo cavernoso y las arterias peneanas (Ignarro y col., 1990; Holmquist y col., 1991a; Kim y col., 1991; Pickcard y col., 1991; Rajfer y col., 1992). Consecuentemente, la respuesta eréctil producida por la estimulación del nervio cavernoso o a nivel

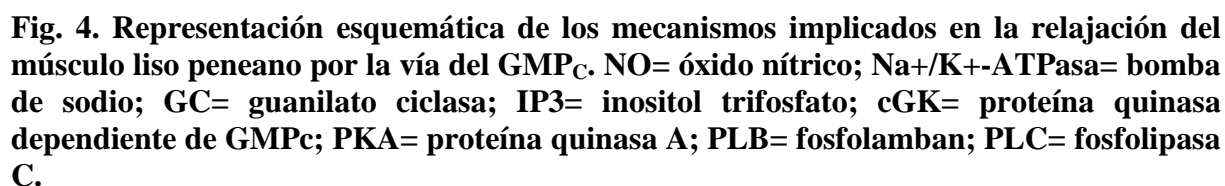
espinal, se previene tras inhibir la síntesis de NO (Holmquist y col., 1991b; Burnett y col., 1992; Finberg y col., 1993; Trigo-Rocha y col., 1993).

La presencia de eNOS en el endotelio de los sinusoides del cuerpo cavernoso y de los vasos sanguíneos peneanos, constituye otra fuente de NO en el tejido eréctil. El aumento del flujo sanguíneo peneano cuando comienza la erección, puede producir un fenómeno conocido como “shear stress” y que consiste en que el flujo sanguíneo ejerce una serie de fuerzas tangenciales sobre la pared arterial que son más intensas cuando el flujo aumenta. El endotelio reacciona ante este hecho produciendo la activación de la proteína quinasa, Akt (también conocida como PKB), que fosforila la eNOS causando su activación y, por tanto, facilitando la liberación de NO (Hurt y col., 2002). Por otra parte, cuando la sangre oxigenada entra en el cuerpo cavernoso, las sustancias circulantes como la bradiquinina o el oxígeno pueden activar la producción de NO endotelial. En base a estos fundamentos, se acepta generalmente que el NO liberado de las terminaciones nerviosas es responsable del inicio de la relajación del músculo liso y la erección, mientras que el NO derivado del endotelio es responsable de mantener la erección (Saénz de Tejada y col., 2004).

Aunque es indudable el papel de la nNOS en el proceso de la erección, inesperadamente se observó que los ratones “knock-out” para la nNOS (no pueden expresar esta proteína) eran fértiles y presentaban una producción de NO normal en la respuesta neurogénica (Burnett y col., 1996). Este hecho contradictorio se aclaró cuando se descubrió la existencia de una variante de la nNOS, la nNOS peneana o PnNOS, que se expresaba en el pene de los ratones “knock-out” para la nNOS (Gonzalez-Cadavid y col., 2000).

La molécula diana del NO no es un receptor de membrana, sino que atraviesa ésta y se une a la enzima citoplasmática guanilato-ciclasa soluble (GCs) en el músculo liso. El NO induce un cambio conformacional en la enzima que aumenta su actividad (Hobbs, 1997). La activación de la GCs estimula la conversión del guanosín-5'-trifosfato (GTP) a guanosín 3',5' monofosfato cíclico (GMPc). La acumulación de GMPc en la célula muscular lisa lleva a una cascada bioquímica intracelular que finaliza con una alteración en la permeabilidad de los canales de calcio y potasio, cuyo resultado final es la disminución de la concentración de calcio citosólico causando la relajación del músculo liso y, por tanto, aumentando el flujo sanguíneo en el pene (Saenz de Tejada y col., 2004) (fig. 4).

La proteína quinasa dependiente de GMPc (cGK ó PKG) se activa tras el incremento de los niveles intracelulares de éste último. Se han identificado 2 isoformas: cGKI y cGKII (Lohmann y col., 1997). Se han detectado altos niveles de cGKI en células musculares lisas vasculares e intestinales (Keilbach y col., 1992). La familia de cGKI consiste en dos subunidades (cGKI α y cGKI β). Aunque cGKI α y cGKI β difieren en la distribución y en las propiedades funcionales, ambas subunidades están presentes en la musculatura lisa del tejido cardiovascular (Sausbier y col., 2000; Münzel y col., 2003) y en la



Las prostaglandinas E (PGE₁ y PGE₂) (Daley y col., 1996; Moreland y col., 2001) y la prostaciclina (PGI₂) (Hedlund, 1985a; Jeremy, 1986) sintetizadas por el músculo liso y el endotelio, el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) en los nervios autonómicos (Ottesen, 1984; Hedlund, 1985b), así como las catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) circulantes y neuronales (Adaikan, 1981), estimulan receptores específicos acoplados a proteínas Gs que activan la enzima adenilato-ciclasa

(AC), que cataliza la conversión de ATP en AMP_c (Zaccolo, 2009; Calebiro y col., 2010). Aunque parece que, en la respuesta eréctil fisiológica, la vía del AMP_c no juega el papel predominante, la estimulación de esta vía produce una relajación eficaz del músculo liso peneano y una respuesta eréctil efectiva. Lo más probable es que la activación coordinada de ambas vías, la del GMP_c y la del AMP_c, sea responsable de la erección fisiológica (Kim y col., 2000; Uckert y col., 2004) (fig. 5).

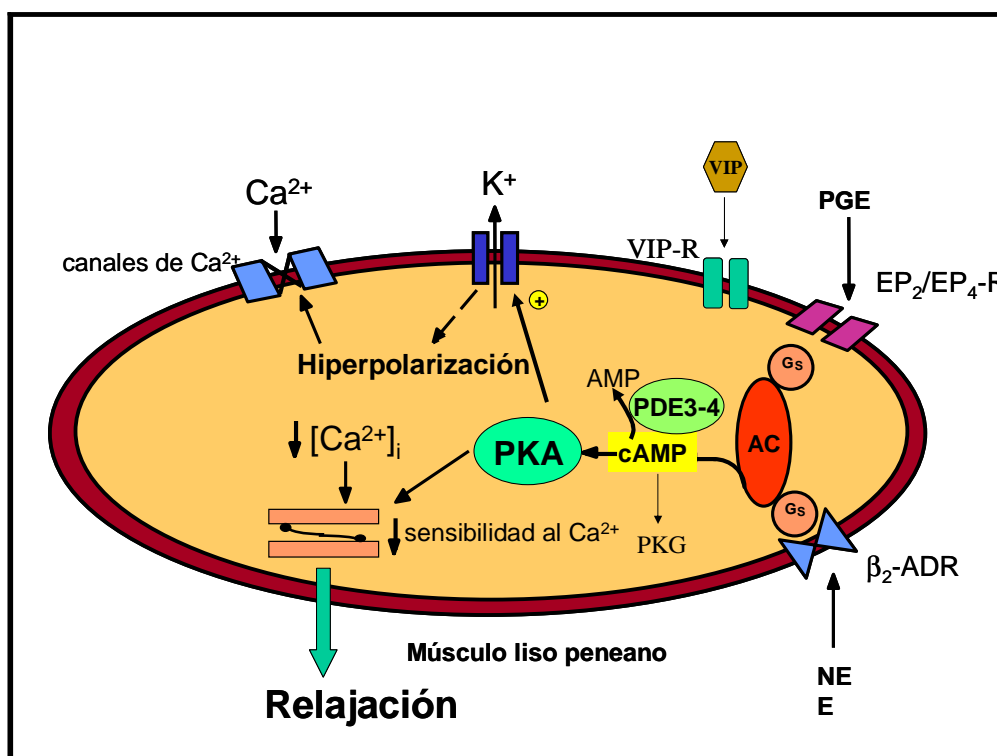


Fig. 5. Representación esquemática de los mecanismos involucrados en la relajación del músculo liso peneano por la vía del AMP_c. NE= norepinefrina; E= epinefrina; β_2 -ADR= receptor adrenérgico β_2 ; EP₂/EP₄-R= receptor prostanoide para la prostaglandina tipo E; VIP-R= receptor para el péptido intestinal vasoactivo; AC= adenilato ciclasa; Gs= proteína G estimuladora; PKA= proteína quinasa A.

Hiperpolarización de la célula muscular lisa

La hiperpolarización es cualquier cambio en el potencial de membrana de la célula, que hace que esté más polarizada. Es decir, la hiperpolarización es un incremento en el valor absoluto del potencial de membrana de la célula. Así pues, los cambios en el voltaje de la membrana en los que los potenciales de membrana son más netamente positivos o negativos, son hiperpolarizaciones. La hiperpolarización del músculo liso causa la clausura de los canales de calcio dependientes de voltaje presentes en la membrana plasmática, lo que previene la entrada de calcio extracelular, causando la reducción de la concentración intracelular de calcio y la consecuente relajación del músculo liso.

Introducción

vascular o trabecular. La apertura de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) o de los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) causa la relajación del músculo liso vascular. En el cuerpo cavernoso humano se ha demostrado la existencia, a nivel funcional, de estos dos tipos de canales (Christ y col., 1993). La estimulación farmacológica de los canales K_{ATP} produce la relajación del músculo liso peneano arterial (Ruiz Rubio y col., 2004) y trabecular (Venkateswarlu y col., 2002). De hecho, la administración intracavernosa de un activador de los K_{ATP} , PNU-83757, causa respuestas eréctiles en pacientes con disfunción eréctil (Vick y col., 2002). La activación de los K_{Ca} de gran conductancia, que también se conocen como maxi-K ó BK, produce la hiperpolarización y relajación del cuerpo cavernoso humano (Spektor y col., 2002).

Esta apertura de los K_{Ca} puede ser provocada por la proteína quinasa AMP_C - dependiente (PKA), por la proteína quinasa GMP_C -dependiente (cGK) o por el propio GMP_C . En células musculares lisas del cuerpo cavernoso humano se ha observado una activación de los canales BK por la PGE_1 (Lee y col., 1999) y por el NO (Lee y col., 2001), siendo mediados dichos efectos por AMP_C y GMP_C , respectivamente. Independientemente de este mecanismo, provocado por la acción de los nucleótidos cíclicos, se ha propuesto que el NO puede estimular directamente la apertura de los canales de potasio así como la actividad de la bomba de sodio (Na^+/K^+ -ATPasa). Este último mecanismo se ha demostrado en el cuerpo cavernoso humano (Gupta y col., 1995). La Na^+/K^+ -ATPasa es electrogénica, debido a que extrae 3 cargas positivas ($3 Na^+$) e internaliza solamente 2 cargas positivas ($2 K^+$). La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa causa la hiperpolarización de la célula, cerrando los canales de calcio del mismo modo a la acción descrita para los canales de potasio.

La hiperpolarización del músculo liso juega un papel importante en la relajación dependiente de endotelio en las arterias de resistencia del pene humano, que es parcial o totalmente resistente a inhibidores de la NOS y de la síntesis de prostaglandinas (Angulo y col., 2003a), y puede tener lugar sin un aumento de los niveles de los nucleótidos cíclicos en las células musculares lisas. Este componente de la relajación endotelial se previene bloqueando los canales K_{Ca} o impidiendo la hiperpolarización con una concentración elevada de potasio extracelular (Angulo y col., 2003a; Eichler y col., 2003; Grgic y col., 2009; Garland y col., 2011) y se debe muy probablemente a un factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), que abre los canales K_{Ca} y produce hiperpolarización y vasodilatación (fig. 6). La relevancia del EDHF (Chen y col., 1988; Félétou y col., 1988) en la relajación endotelial se ha demostrado en varios vasos sanguíneos de diferentes especies, incluyendo la humana, jugando un papel importante en la fisiología cardiovascular. La contribución de las respuestas mediadas por el EDHF como un mecanismo de relajación dependiente de endotelio aumenta en cuanto el calibre del vaso disminuye, y además se ha observado que en los lechos vasculares coronarios y renal el EDHF desempeña un papel especialmente relevante. No se ha dilucidado la naturaleza del

EDHF, aunque se han propuesto diversos candidatos, como los derivados del ácido araquidónico, los ácidos epoxyeicosatrienoicos, originados por la actividad de las citocromo P450 oxigenasas (Rosolowsky y col., 1993; Hecker y col., 1994; Fisslthaler y col., 1999; Archer y col., 2003), el ion potasio (Edwards y col., 1998; Beny y col., 2000; Nelli y col., 2003), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en arterias mesentéricas humanas y de ratón (Matoba y col., 2000; Matoba y col., 2002) y en microvasos coronarios de cerdo (Matoba y col., 2003), la anandamida (Randall y col., 1998; Randall, 2003) y el péptido natriurético de tipo C (CNP) (Chauhan y col., 2004; Villar y col., 2007; Kun y col., 2008).

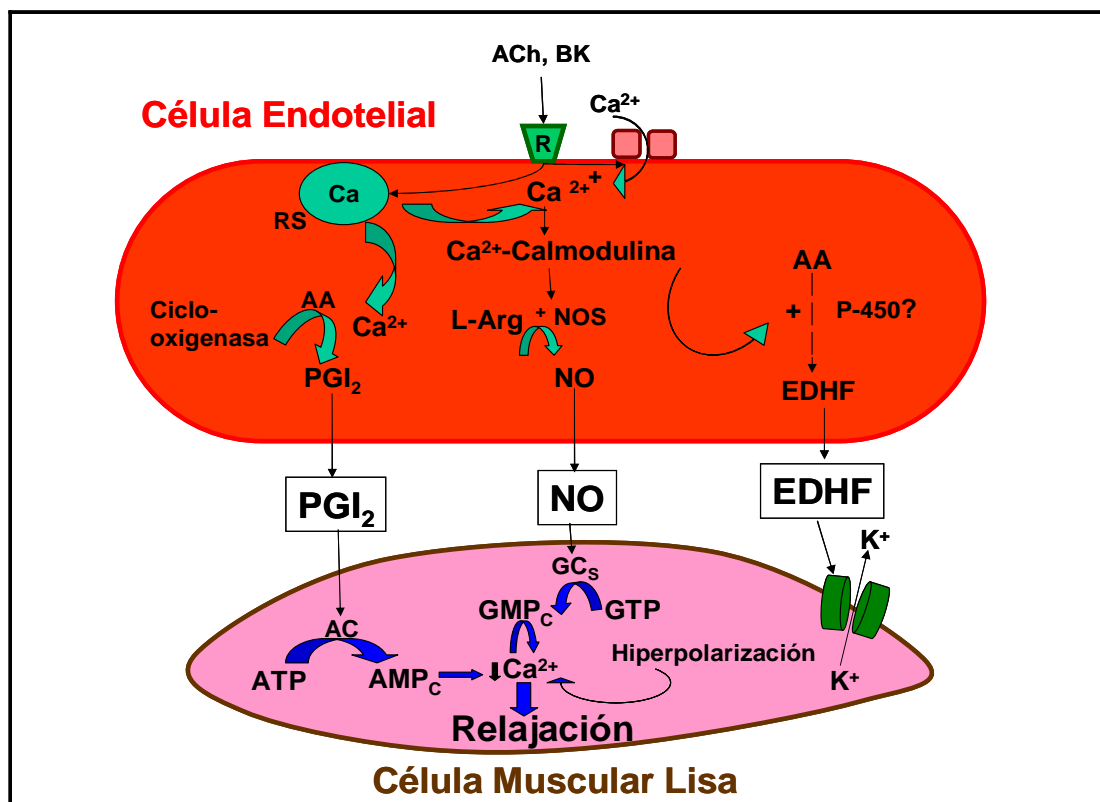


Fig. 6. Representación esquemática de la relajación endotelial. La activación del receptor endotelial (R) induce el influxo de Ca^{2+} al citoplasma de la célula endotelial. Los agonistas incrementan el inositol trifosfato (IP_3) contribuyendo al incremento del Ca^{2+} citoplasmático por su liberación desde el retículo sarcoplásmico (RS). Después de la interacción con la calmodulina, el Ca^{2+} activa a la óxido nítrico sintasa (NOS). Una cascada bioquímica diferente promueve la liberación del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). Este incremento de Ca^{2+} en la célula endotelial también promueve la formación de prostaciclina (PGI_2) a partir del ácido araquidónico (AA) por la ciclooxigenasa. El NO causa relajación al estimular la formación de GMP_c a partir de GTP. La prostaciclina causa relajación al activar la formación de AMP_c a partir del ATP. El EDHF causa hiperpolarización y relajación por la apertura de los canales K^+ . (Imagen modificada de Boulanger y col., 1997).

También se ha sugerido que la elevación del calcio intracelular en la célula endotelial en respuesta a los vasodilatadores endoteliales causa una activación de los canales K_{Ca} (Félétou, 2009; Grgic, 2009).

Así se produce la hiperpolarización del endotelio, que se transmite al músculo por medio de uniones intercelulares (uniones gap) mioendoteliales (Ungvari y col., 2002), causando la relajación arterial. En este escenario, el papel fisiológico real del EDHF en la regulación del tono vascular no está completamente esclarecido, debido al desconocimiento de su auténtica naturaleza y a la ausencia de inhibidores específicos. Sin embargo, se ha establecido que las respuestas mediadas por EDHF en las arterias peneanas humanas son potenciadas por el agente angioprotector, dobesilato de calcio (Angulo y col., 2003a). La administración intravenosa de este fármaco también aumenta las respuestas eréctiles *in vivo* en ratas, lo que sugiere un papel fisiológico del EDHF en la erección, una idea reforzada por el hecho de que la co-administración de dobesilato potencia significativamente la eficacia del sildenafil para revertir la disfunción eréctil en ratas diabéticas (Angulo y col., 2005).

Fosfodiesterasas

En las vías de señalización del GMP_c y del AMP_c las enzimas fosfodiesterasas (PDEs) regulan los niveles de nucleótidos cíclicos hidrolizando su enlace fosfo-di-éster, degradando el GMP_c y AMP_c y, dando lugar a GMP y AMP, respectivamente. Así finalizan las acciones (relajación) de los nucleótidos cíclicos. La clase de las PDEs está integrada por 11 familias designadas del 1 al 11, que presentan uno o varios genes (21 genes distintos) (Lin y col., 2003; Montorsi y col., 2004) designados con letras de A a D que a su vez pueden tener variaciones en la maduración del ARNm, que dan lugar a variantes designadas por números: por ejemplo PDE5A1. La PDE1, PDE3, PDE4, PDE7 y PDE8 son familias multigénicas, mientras que la PDE2, PDE5, PDE9, PDE10 y PDE11 son familias de un solo gen. Se clasifican por su especificidad o preferencia por AMP_c ó GMP_c, por los requerimientos, los moduladores alostéricos y el efecto de inhibidores conocidos. PDE4, PDE7 y PDE8 sólo hidrolizan AMP_c; PDE5, PDE6 y PDE9 hidrolizan únicamente GMP_c; y PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 y PDE11 pueden hidrolizar ambos nucleótidos cíclicos. En la familia de la PDE3 aunque el GMP_c es capaz de unirse al centro catalítico de estas enzimas, la baja velocidad de hidrólisis hace pensar que en este caso la función fisiológica de este nucleótido es la de inhibir la hidrólisis del AMP_c por parte de esta fosfodiesterasa (Manganiello y col., 1995; Francis y col., 2001; Conti y col., 2007). En el tejido peneano humano, se ha detectado, a nivel de ARN mensajero (ARNm), la presencia de PDE1A-C, PDE2A, PDE3A, PDE4A-D, PDE5A, PDE7A, PDE8A y PDE9A (Küthe y col., 2001). En experimentos bioquímicos de hidrólisis de AMP_c y GMP_c en tejido peneano humano, empleando técnicas de purificación cromatográfica, se ha detectado la actividad de PDE2 (AMP_c/GMP_c y estimulada por GMP_c), PDE3 (AMP_c e inhibida por GMP_c) y PDE5 (específica de GMP_c) (Wallis y col., 1999). Sin embargo, mediante el empleo de inhibidores selectivos también se ha sugerido la presencia de

actividad PDE4 (específica de AMP_C) en las células del cuerpo cavernoso humano (Bivalacqua y col., 1999). Además, la inhibición de esta isoenzima potencia las respuestas eréctiles mediadas por AMP_C en gatos (Bivalacqua y col., 1999) y provoca la relajación del cuerpo cavernoso de mono y humano (Lau y col., 2007). Por otra parte, es necesario apuntar que el patrón de actividad fosfodiesterasa varía con la especie estudiada, ya que, en el cuerpo cavernoso de conejo, se ha observado actividad de PDE1, PDE2 y PDE5, mientras que no se ha detectado actividad de PDE3 (Qiu y col., 2000), aunque la inhibición de la PDE4 con rolipram también provoca la relajación de este tejido (Sparwasser y col., 1994).

La fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) hidroliza específicamente GMP_C y se expresa en el tejido peneano, tanto en el cuerpo cavernoso como en las arterias de resistencia peneanas, siendo la principal encargada de regular los niveles de GMP_C en el tejido eréctil (Boolell y col., 1996). Su inhibición provoca el incremento de la actividad de la vía NO/GMP_C potenciando la relajación del músculo liso peneano y la erección del pene en respuesta a la estimulación sexual (Ballard y col., 1998). Los inhibidores de la PDE5 constituyen actualmente la principal herramienta terapéutica en el tratamiento de la disfunción eréctil (Eardley y col., 2002; Corbin y col., 2004; Fazio y col., 2004; Francis y col., 2005; Carson, 2006; Fusco y col., 2009; Dorsey y col., 2010; Giovannoni y col., 2010). Aunque los inhibidores de la PDE5 muestran una elevada eficacia clínica en el tratamiento de la disfunción eréctil, esta eficacia es significativamente más baja en algunos grupos específicos de pacientes, como los pacientes diabéticos (Rendell y col., 1999; Saenz de Tejada y col., 2002; Goldstein y col., 2003; Fonseca y col., 2004; Lau y col., 2006; Nhera, 2009; Cho y col., 2010). Por lo tanto, se hace necesario disponer de estrategias terapéuticas alternativas para mejorar la eficacia de los tratamientos disponibles para los pacientes diabéticos con disfunción eréctil.

Canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) en tejido eréctil humano

Como se ha mencionado anteriormente, la activación de los canales de potasio produce la hiperpolarización de las células musculares lisas y, consecuentemente, la relajación del tejido eréctil. Este modo de promover la relajación del músculo liso peneano puede representar una estrategia alternativa o complementaria a la estimulación de la vía del NO/GMP_C.

Clasificación y características de los canales de potasio

Representan la categoría más diversa de los canales iónicos, con más de 20 subtipos descritos. Se expresan en todas las células conocidas y juegan un importante papel en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, la frecuencia de disparo de las células automáticas, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por células epiteliales, la regulación del tono del músculo liso y la regulación del volumen celular. Su alteración provoca disminución de la repolarización, generando un aumento de la hiperexcitabilidad.

La clasificación de los canales de potasio está basada en la estructura peptídica que conforma las subunidades que forman el poro, que para cada tipo están codificadas por diferentes genes. De esta forma se pueden clasificar estructuralmente en tres grupos: 1) Canales de seis regiones transmembrana y un poro (canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) y K_{Ca}), 2) Canales de dos segmentos transmembrana y un poro (canales de potasio rectificadores de entrada rápida, Kirs) y 3) Canales con cuatro segmentos transmembrana y dos poros (canales de potasio rectificadores de entrada lenta).

El canal de potasio es un tetrámero, formado por 4 subunidades idénticas α y 4 subunidades β (fig.7).

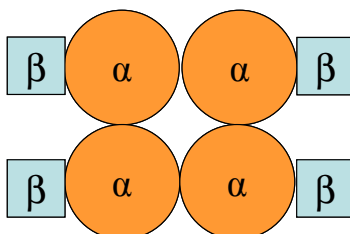


Fig. 7. Representación esquemática de la estructura del canal de potasio. Cuatro subunidades α hidrofóbicas unidas con su respectiva unidad β hidrofílica. Las cuatro subunidades son independientes y se asocian para formar el canal.

Los K_v se abren y cierran en respuesta a cambios en el potencial de membrana, de forma que señales de depolarización o de hiperpolarización pueden aumentar su apertura generando una corriente de rectificación de salida o de entrada respectivamente. Se expresan en neuronas, corazón, retina, islotes pancreáticos, cerebro, pulmón, riñón y músculo esquelético. Los K_{Ca} se activan por incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Estos canales se describirán con más detenimiento porque son los más relevantes en el enfoque de este estudio.

Los canales Kirs permiten el paso del potasio hacia el interior celular cuando la membrana plasmática se encuentra a un voltaje más negativo que su potencial de equilibrio y se encuentran cerrados a potenciales más positivos, por lo que se denominan, canales de potasio rectificadores de entrada (Kir,

K inwardly rectifier). Se encuentran en el corazón, en músculo esquelético, riñón, páncreas, pulmón, placenta, cerebelo, glia, retina y cerebro. De los canales rectificadores de entrada se encuentran dos subfamilias importantes, los regulados por proteínas G, que están asociados a los receptores muscarínicos M3 de ACh (K_{ACh}) y son activados tras la estimulación del receptor colinérgico y los sensibles a ATP (K_{ATP}), como los que regulan la secreción de insulina en las células β pancreáticas. Los canales K_{ATP} son un complejo octamérico formado por dos proteínas diferentes (Clement y col., 1997). Una, los Kir6, es un miembro de la familia de los canales Kir que constituyen el poro del canal formado por cuatro subunidades. La otra proteína es un receptor de sulfonilureas (SUR), que es un miembro de la familia de transportadores ATP-binding cassette (ABC), uniéndose cada subunidad reguladora, con sitio de unión de ATP, con una subunidad del poro (Antcliff y col., 2005; Colin, 2006). Los K_{ATP} se detectaron en primera instancia en los miocitos cardiacos (Noma, 1983; Trube y col., 1984), y después, en las células β pancreáticas (Cook y col., 1984), músculo esquelético (Spruce y col., 1985), en neuronas (Ashford y col., 1988; Bernardi y col., 1988; Gehlert y col., 1990), músculo liso vascular y visceral (Standen y col., 1989a), corazón (Ashford y col., 1994), pituitaria (Bernardi y col., 1993), células tubulares del riñón (Wang y col., 1991) y en los condrocitos (Rufino y col., 2013), pero, sobre todo, está extendida su expresión en el músculo liso vascular y visceral (Teramoto, 2006), uretra de cerdo (Teramoto y col., 1997; Teramoto y col., 2000; Yunoki y col., 2003), colon de roedor (Koh y col., 1998), en el estómago (Sim y col., 2002), miometrio humano (Curley y col., 2002; Sawada y col., 2005), cuerpo cavernosos (Insuk y col., 2003) y en la próstata (Haynes y col., 2006). Se les ha atribuido tener un papel fisiológico en la liberación de insulina en el páncreas, en la modulación de la frecuencia del potencial de acción y en la liberación de neurotransmisores (Amoroso y col., 1990), así como en la regulación del tono del músculo liso (Quayle y col., 1994). Además cabe señalar su implicación en la memoria (Betourne y col., 2009) y en la regulación del comportamiento reproductivo masculino (McDevitt y col., 2009).

Los canales de potasio rectificadores lentos representan quizás el tipo más abundante de canales de potasio con más de 50 miembros diferentes. Se ha detectado su expresión en corazón, cerebro, páncreas, placenta, ojos, pulmón, estómago, espina dorsal y riñón (Shieh y col., 1996)

Canales de potasio activados por calcio (K_{Ca})

Los canales K_{Ca} están presentes en una gran variedad de tejidos encontrándose en el cerebro, en la vasculatura, en la vejiga, en la médula espinal y en el tracto gastrointestinal (Becker y col., 1995; Chang y col., 1997) donde están implicados en diversos procesos fisiológicos. Atendiendo a su conductancia, los canales K_{Ca} se clasifican en canales K_{Ca} de gran conductancia (BK; Maxi-K) que

Introducción

tienen una conductancia entre 165 y 220 pS, canales K_{Ca} de conductancia intermedia (IK) que tienen una conductancia entre 60 y 80 pS y canales K_{Ca} de baja conductancia (SK) que tienen una conductancia entorno a 10 pS.

Los BK están compuestos por cuatro subunidades α y por cuatro subunidades β (Knaus y col., 1994; Tanaka y col., 1997). La subunidad α está codificada por un único gen, en células de mamíferos, llamado KCNMA1, conocido por Slo o Slo 1, que constituye el poro del canal y presenta once dominios hidrofóbicos (S0-S10). Estudios recientes sugieren que los dominios transmembrana S0-S6 constituyen la parte central del canal con un extremo NH_2 terminal extracitosólico. Los segmentos hidrofóbicos S7-S10 se localizan en el citoplasma y forman el extremo $COOH$ terminal de la proteína (fig. 8). El segmento S4 es un sensor intrínseco de voltaje que presenta aminoácidos cargados positivamente. El bucle entre S5-S6 forma el poro de este canal (ruta de conducción de los iones K^+), además de ser la diana para la iberitoxina (IbTx), la caribdotoxina (ChTx) y el tetraetilamonio (TEA). La actividad de este canal está fundamentalmente regulada por las subunidades β (cuatro tipos codificados por genes KCNMB1-4), que presenta dos regiones transmembrana y extremos terminales NH_2 y $COOH$ orientados hacia el citoplasma. Las propiedades funcionales de las subunidades β son esenciales en la diversidad de los efectos moduladores sobre las propiedades fenotípicas, la activación y la farmacología del BK (Knaus y col., 1994; Xia y col., 1999; Uebele y col., 2000; Xia y col., 2000) (fig. 8). La subunidad predominante en las células musculares lisas vasculares es la isoforma β_1 (Knaus y col., 1994; Tanaka y col., 1997). La subunidad β_1 interactúa con el dominio S0 y el extremo NH_2 terminal de la subunidad α , de tal modo que incrementa la sensibilidad del canal al voltaje y al calcio (Knaus y col., 1996; Brenner y col., 2000; Petkov y col., 2001; Nishimaru y col., 2004).

Se ha detectado la expresión de los BK en neuronas, en diversas zonas del epitelio renal, en el epitelio del colon distal, en las vías respiratorias y en las lentes (Frind y col., 1987; Lu y col., 1990; Grunnet y col., 2005, Grunnet y col., 1999, Tamaoki y col., 1998, Rae y col., 1998) y una elevada expresión en las células musculares lisas y en algunas células endoteliales (O'Neill y col., 1995, Holland, 1996, Herrera y col., 2001).

Jensen y sus colaboradores describieron los niveles de expresión del canal IK en 50 tejidos humanos (Jensen y col., 1998). El IK fue descrito por primera vez en los eritrocitos (Gardos., 1956; Maher y col., 2003) y posteriormente se confirmó su papel en la activación de las células T y en la respuesta inmune (Jensen y col., 2001; Jensen y col., 2002). Se ha detectado una intensa expresión del canal IK en células sanguíneas, en células epiteliales, en células musculares lisas y en el endotelio (Wulff y col., 2000; Sogaard y col., 2001), en las glándulas salivares, en la placenta, en el pulmón, en la tráquea y una débil expresión en el hígado, colon, timo, riñón y médula ósea. No se observó expresión en tejidos excitables como cerebro y músculo esquelético y cardiaco (Chen y col., 2004). Como en el caso de los

BK, estos canales presentan cuatro subunidades, cada subunidad consiste en 6 dominios transmembrana (S1-S6) y un extremo N-terminal y C-terminal, ambos intracelulares (Xia y col., 1998). La región del poro (S5-S6) es la única región del canal que presenta homología con el resto de familias de los canales de K^+ . Cabe destacar, que esta familia de canales presenta falta de sensibilidad a voltaje aún en presencia de aminoácidos cargados en el dominio transmembrana 4. Se ha demostrado que la proteína Ca-Calmodulina está presente en el extremo COOH terminal, lo que confiere al canal una extremada sensibilidad submicromolar al calcio citoplasmático (Fanger y col., 1999; Schumacher y col., 2001; Schumacher y col., 2004).

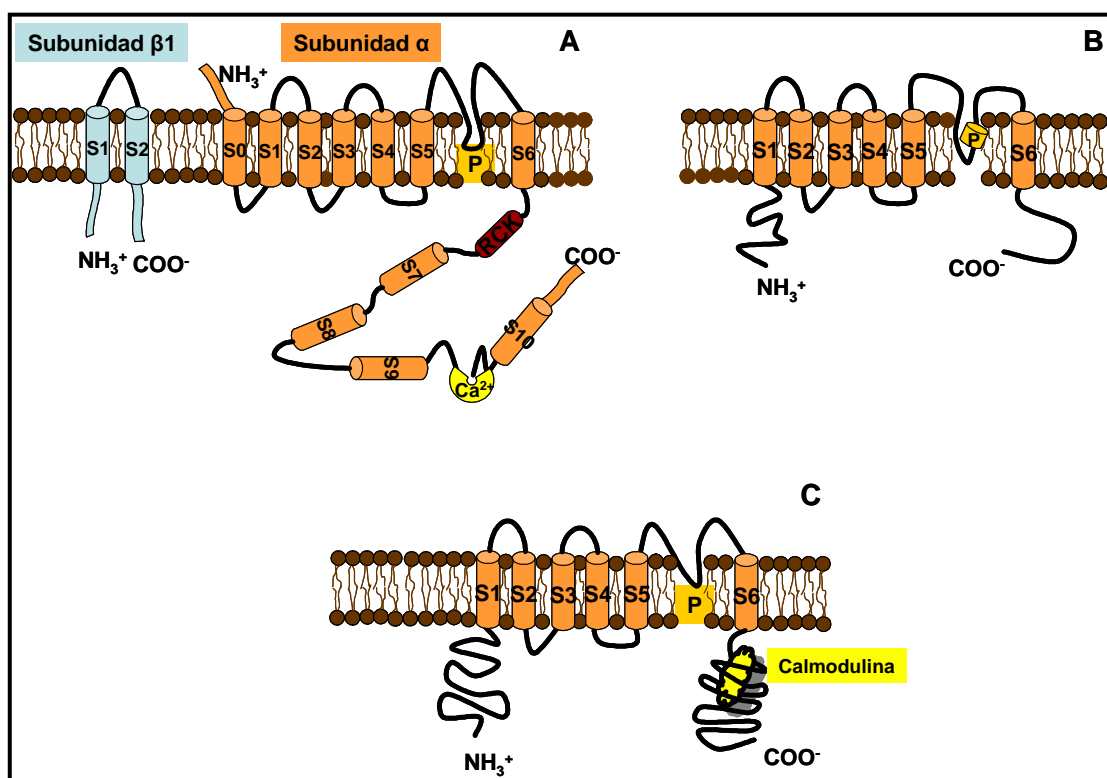


Fig. 8. Representación esquemática de los K_{Ca} . A) Representación de la estructura de las subunidades α y $\beta 1$ de los canales de potasio BK. La subunidad $\beta 1$ consiste en dos dominios transmembrana y la subunidad α de 11 dominios hidrofóbicos (S0-S10), con S0-S6 localizados en la membrana celular y la región del poro (P) entre S5-S6. B) Representación de la topología de la subunidad monomérica del canal IK en la membrana celular. Las regiones S1-S6 son los 6 dominios transmembrana y “P” representa la región del poro del canal. C) Estructura del canal SK. Consiste en seis dominios transmembrana, una región del poro (P) entre S5 y S6 y la interacción de la Calmodulina con el canal en el extremo COO^- terminal.

Respecto a los SK, se han identificado cuatro miembros de la misma familia SK1-SK4, codificados por los genes KCNN1-KCNN4. Los hSK4 generan una conductancia de 12 pS, tienen una alta afinidad por el Ca^{2+} (EC_{50} de 95nM) y presentan una elevada expresión en tejidos no excitables de animales adultos. Esto, junto a que presentan una baja homología (aproximadamente un 40% de similitud) con el

resto de canales SK sugiere que los hSK4 son un nuevo miembro dentro de la familia de los SK (Köhler y col., 1996; Ishii y col., 1997a; Joiner y col., 1997; Logsdon y col., 1997; Khanna y col., 1999; Warth y col., 1999). Los canales SK1 son específicos de neuronas mientras que SK2, SK3 están ampliamente distribuidos. Junto a los IK, SK1 son los canales mayoritarios en las neuronas entéricas del colon, SK2 en glándula adrenal, cerebro, próstata, vejiga, hígado y corazón y SK3 se detectaron en cerebro, tejidos ricos en músculo liso vascular y de colon (Fujita y col., 2001; Ro y col., 2001) incluyendo el clítoris, el cuerpo cavernoso, el endotelio vascular (Chen y col., 2004; Bahia y col., 2005; Mongan y col., 2005) y el urotelio de la vejiga de ratón, donde se ha demostrado que tiene un papel funcional en el control de la micción (Herrera y col., 2003). Esta diferencia en la distribución de los canales SK e IK sugiere que cada subtipo de canal está implicado en distintos procesos biológicos, y pueden ser diana de tratamientos específicos para alteraciones gastrointestinales, vasculares y eréctiles, así como para la hipertensión y la enfermedad inflamatoria intestinal (Chen y col., 2004).

Farmacología de los K_{Ca}

El empleo de toxinas que bloquean potente y selectivamente tipos particulares de canales de K^+ al igual que el empleo de activadores permite indagar sobre su papel fisiológico. Estos canales son muy selectivos para el K^+ , y fundamentalmente excluyen el paso de otros iones fisiológicos, excepto el ion amonio. Los canales BK se bloquean por TEA que es un bloqueante clásico poco específico de los canales de K^+ , y por una serie de alcaloides tremorgenicos, incluyendo la paxilina (Sanchez y col., 1996; Li y col., 1999), así como algunos inhibidores específicos procedentes de toxinas de escorpión como la iberiotoxina (Kaczorowski y col., 1996; Giangiacomo y col., 1992) y la caribdotoxina (Galvez y col., 1990; Gribkoff y col., 1997). La iberiotoxina es una proteína de 37 aminoácidos aislada del escorpión *Buthus tamulus* que inhibe selectivamente la corriente de los canales BK uniéndose a la cara externa del canal con una alta afinidad ($K_d \sim 1\text{nM}$) y presenta un 68% de homología en la secuencia con la caribdotoxina. La caribdotoxina es una proteína básica de 37 aminoácidos, aislada también del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, muy útil en el estudio de canales de K^+ activados por Ca^{2+} no bloqueados por apamina. La caribdotoxina bloquea los canales BK en numerosos tipos celulares (Millar y col., 1985; Frey y col. 1998; Giangiacomo y col., 2000; Bergeron y col., 2012) así como los IK (Wulff y col., 2000; Chandy y col., 2004). En la mayoría de los casos actúa en el rango nanomolar, uniéndose a la cara interna del canal (Gimenez-Gallego y col., 1988). En cuanto a los activadores, además del calcio intracelular, se ha descrito el papel funcional de ciertos abridores de los BK nativos y clonados (Gribkoff y col., 1996). Por ejemplo, las benzimidazolonas, NS1608 y NS1619, activan los canales BK (Olesen y col., 1994; Strobaek y col., 1996). Además de estos fármacos, se ha descrito la influencia de otras sustancias sobre la actividad de los canales BK,

por ejemplo, se ha demostrado que altas concentraciones de estrógenos (micromolar) se unen a los canales BK, sobre todo a la subunidad $\beta 1$, regulando directamente la expresión y la actividad del canal (Valverde y col., 1999; Dick y col., 2001; Korovkina y col., 2004). También se ha descrito que proteínas con grupo hemo y especies reactivas de oxígeno modulan la actividad del canal BK del músculo liso vascular interfiriendo con la subunidad α e inhibiendo la actividad fisiológica del canal (Tang y col., 2003; Tang y col., 2004). Por último, se ha descrito que el etanol inhibe los canales BK en el músculo liso vascular, permitiendo un incremento de la vasoconstricción (Walters y col., 2000; Dopico, 2003; Lyu y col., 2004). Los canales IK son bloqueados por el TEA (Chandy y col., 2004) y como se ha mencionado, la caribdotoxina que también inhibe a los BK. Otros bloqueantes más específicos son el clotrimazol (Chandy y col., 2004; Wulff y col., 2000) y el TRAM-34 (20nM) (Chandy y col., 2004; Wulff y col., 2000). En cuanto a los activadores cabe citar al EBIO, DCEBIO (Singh y col., 2001) y el NS309 (Strobaek y col., 2004).

El grupo de los canales SK1-SK3 es altamente sensible a una toxina procedente de la abeja (*Apis mellifera*), la apamina (Shah y col., 2000; Ishii y col., 1997p), que presenta distinta afinidad por las tres subclases de SK (SK1, SK2 y SK3), siendo la SK2 la más sensible, intermedia para SK3 y baja afinidad por SK1 (Blatz y col., 1986; Cook y col., 1985). La apamina es una pequeña proteína de 18 aminoácidos que es muy selectiva en su acción, sin interferir con los canales de tipo BK (Pennefather y col., 1985; Chicchi y col., 1988). La apamina actúa bloqueando el poro, participando los aminoácidos de dentro y fuera de la región del poro en la unión con la toxina. Otros inhibidores de los canales SK son la bicuculina (Khawaled y col., 1999), decualinio (Castle y col., 1993) y su potente derivado el UCL 1684 (Dunn, 1999; Strobaek y col., 2000). Por otro lado, todos los SK son estimulados por cloroxazona (Cao y col., 2001), zoxazolamina (Cao y col., 2001), riluzol (Grunnet y col., 2001), 1-etil-2-benzimidazolinona (1-EBIO) (Adeagbo, 1999; Dale y col., 2002; Pedarzani y col., 2002) y por el NS309 (Syme y col., 2000; Strobaek y col., 2004).

Los K_{Ca} en tejido eréctil humano

Como se ha mencionado anteriormente los K_{Ca} se han identificado en el cuerpo cavernoso humano (Chen y col., 2004) y se ha sugerido su participación en la relajación inducida por la vía del NO/GMP_c (Lee y col., 2001; Sand y col., 2006; Lunardi y col., 2007). También se han propuesto como mediadores de la relajación inducida por la vía del factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) en las arterias peneanas humanas (Angulo y col., 2003a). Otra evidencia relevante de la participación de estos canales en la fisiología de la función eréctil es el hecho de que ratones carentes del gen que codifica para el BK muestran disfunción eréctil (Werner y col., 2005). El subtipo BK ha sido el más

estudiado y se ha sugerido su participación en la regulación del tono del músculo liso cavernoso humano (Spektor y col., 2002) favoreciendo su relajación y potencialmente, por tanto, la erección. Además, la transferencia del gen BK humano (hSlo) en el pene restaura la capacidad eréctil disminuida por el envejecimiento en ratas (Melman y col., 2003) y recupera la función eréctil en las ratas diabéticas (Christ y col., 2004). De hecho, se ha llevado a cabo un ensayo clínico preliminar en el que se ha evaluado la administración intracavernosa del gen hSlo (que codifica para la expresión de BK) como terapia génica para el tratamiento de la DE (Melman y col., 2005; Melman y col., 2006). Los resultados preliminares indican, que, en un estudio de dosis escalada única (500, 1000, 5000 ó 7500 μg del hSlo cDNA) se puede administrar con seguridad a los pacientes con DE, sin efectos adversos. La transferencia génica enfocada en los canales iónicos en el músculo liso de órganos como el pene y la vejiga ofrece una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la DE y la vejiga hiperactiva (Christ y col., 2009; Melman y col., 2009). Además de la terapia génica cabe la posibilidad de una modulación farmacológica (fig. 9) ya que existen activadores de los canales K_{Ca} que tienen la capacidad de relajar el músculo liso peneano humano y de rata (Spektor y col., 2002; Hewawasam y col., 2004, Kun y col. 2009).

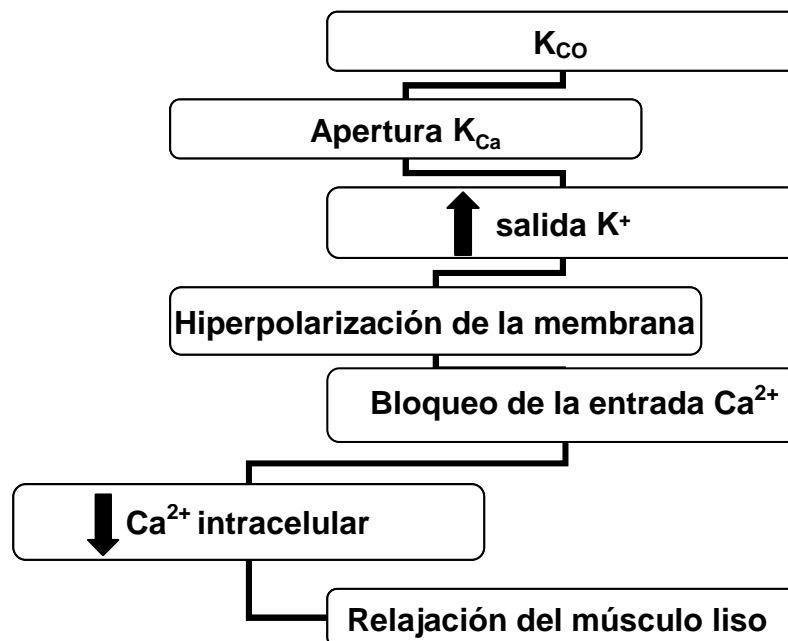


Fig. 9. Secuencia de los eventos implicados en la relajación del músculo liso por los activadores de los K_{Ca} (K_{CO}).

Disfunción eréctil

La disfunción eréctil (DE) se define como: “La incapacidad persistente para lograr y/o mantener una erección suficiente que permita alcanzar una actividad sexual satisfactoria” Una duración de tres meses de estos síntomas es suficiente para establecer el diagnóstico excepto para algunos casos de DE causado por trauma o por cirugía (Lewis y col., 2010). La DE es la disfunción sexual con mayor impacto sobre la sexualidad del hombre. La severidad de la DE se evalúa a través de varios índices, siendo el más empleado el Índice Internacional de Función Eréctil (IIEF) (Rosen y col., 1997) Se calcula que 150 millones de hombres en el mundo padecen cierto grado de DE y se estima afectará a 300 millones de hombres en 2025 (Ayta y col., 1999). El primer gran estudio epidemiológico en este campo, el Massachussets Male Aging Study, sitúa la prevalencia de la DE en un 52% en hombres de edad comprendida entre 40 y 70 años y en un 70% en hombres mayores de 70 años (Feldman y col., 2000). El estudio epidemiológico más importante realizado en España (Martín-Morales y col., 2001) reveló que la DE afecta a entre un 12% y un 19% de la población masculina entre 25 y 70 años. Aunque es más prevalente en la edad avanzada, el estudio de los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos de la erección sugiere que la DE no es un trastorno vinculado inevitablemente a la edad sino que se asocia con una serie de alteraciones cuya prevalencia es más elevada en los individuos de mayor edad. Es un trastorno que puede manifestarse en el varón por múltiples causas, siendo las más frecuentes las enfermedades vasculares y la diabetes (tabla 1).

La etiología de la DE se puede clasificar en:

- Causas vasculares: Consiste en una reducción del flujo sanguíneo hacia los cuerpos cavernosos. Puede estar relacionada con la aterosclerosis y se asocia con dislipidemias, hipertensión arterial, diabetes mellitus, sedentarismo y tabaquismo.
- Causas neurológicas: Alteraciones de las vías neuronales que controlan el proceso de la erección. Pacientes que han sufrido accidentes con secuelas como tetraplejía, paraplejía, y otras, pueden presentar ausencia de erección. También se incluyen en este grupo las DEs secundarias a intervenciones quirúrgicas, como prostatectomías radicales, cistectomías y cirugías sobre el recto.
- Causas farmacológicas: Algunos fármacos, entre los que se encuentran antihipertensivos y antidepresivos, disminuyen la capacidad eréctil. El abuso de drogas (cocaína, anfetaminas) también puede derivar en problemas de erección.

Introducción

- Causas psicogénicas: Son menos frecuentes de lo que se pensaba en un principio. En general producen trastornos pasajeros de la erección, desencadenados por estados de ansiedad y/o depresión, y por situaciones de estrés.

Causas orgánicas de disfunción erétil		
Causas vasculares (60-80%)	Causas neurológicas (10-20%)	Causas hormonales (5-10%)
Arteriosclerosis <ul style="list-style-type: none"> • Tabaquismo • Hiperlipemia • Hipertensión arterial • Diabetes Enfermedad de Peyronie Fracturas pélvicas Traumatismos perineales Fractura de cuerpos cavernosos Trasplante renal heterotópico Síndrome de Leriche Bypass aorto-iliaco o aorto-femoral Secuelas de la radioterapia Secuelas del priapismo	Sistema nervioso central <ul style="list-style-type: none"> • Accidente cerebrovascular • Síndrome de apnea del sueño • Enfermedad de Alzheimer • Enfermedad de Parkinson Tumor cerebral Médula espinal <ul style="list-style-type: none"> • Traumatismos • Hernia discal • Esclerosis múltiple • Tumor medular • Infarto medular • Mielomeningocele • Tabes dorsal Nervios periféricos <ul style="list-style-type: none"> • Neuropatía diabética • Neuropatía alcohólica Secuelas postquirúrgicas <ul style="list-style-type: none"> • Prostatectomía Cistoprostatectomía • Resección transuretral de próstata • Cirugía de la médula espinal • Amputación rectal 	Exceso de estradiol <ul style="list-style-type: none"> • Obesidad • Hepatopatía Hiperprolactinemia <ul style="list-style-type: none"> • Farmacológica • Tumor hipofisario (prolactinoma) Alteraciones del tiroides <ul style="list-style-type: none"> • Hipertiroidismo • Hipotiroidismo Alteraciones suprarrenales <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Cushing • Enfermedad De Addison Hipogonadismo <ul style="list-style-type: none"> • Anorquia • Quimioterapia • Radioterapia • Síndrome de Klinefelter

Tabla 1. Principales causas de DE con su prevalencia aproximada.

Aspectos epidemiológicos de la DE

La DE está íntimamente relacionada con los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) en un doble sentido porque los pacientes que presentan FRCV tienen más probabilidades de padecer DE y los varones con DE presentan mayor número de FRCV. Por ello la DE se considera un síntoma centinela de enfermedad cardiovascular (Corona y col., 2009; Traish y col., 2009; Garcia-Cruz y col., 2012). Entre los factores de riesgo asociados a la DE se incluyen el sedentarismo, el tabaquismo, el abuso de alcohol, la diabetes mellitus, la hipertensión, la dislipemia y la obesidad (Müller y col., 1991;

Mannino y col., 1994; Aytac y col., 2000; Moreira y col., 2002; Shiri y col., 2004; Barret-Connor, 2005) (fig. 10).

Hipertensión arterial (HTA)

La prevalencia de DE es más elevada en los pacientes con HTA (Cuéllar de León y col., 2002; Artom y col., 2015) del mismo modo que, entre los pacientes con DE se incrementa el riesgo de manifestar HTA (Seftel y col., 2004, García-Cruz y col., 2012). Entre los posibles mecanismos fisiopatológicos, la HTA deteriora la función endotelial y favorece la aterosclerosis, comprometiendo el proceso hemodinámico de la erección. También se ha descrito que la HTA puede inducir alteraciones estructurales en el tejido cavernoso. Una reducción de la luz vascular o una disminución de la proporción entre la pared y la luz arterial contribuyen al aumento de la resistencia vascular periférica en la hipertensión (Mulvany y col., 2002). Un aumento de la resistencia también se ha encontrado en la vascularización del pene de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), y estas alteraciones se atribuyen a los cambios estructurales del tejido arterial y eréctil (Okabe y col., 1999; Hale y col., 2001). El aumento de la expansión de la matriz extracelular afecta tanto al intersticio como a las estructuras nerviosas del pene. También se ha observado un aumento del tono basal y miogénico en las arterias de ratas hipertensas. El aumento de la actividad nerviosa simpática que acompaña a la hipertensión también se ha descrito en el hombre y en animales hipertensos (Norman y col., 1986; Mancía y col., 1999). El aumento de la vasoconstricción de los vasos del pene inducida por la infusión de fenilefrina en las SHR, fue atribuida a la hipertrofia de la pared vascular, pero no a la alteración de neurotransmisores simpáticos (Okabe y col., 1999). En las SHR, el efecto relajante de la acetilcolina es mitigado tanto en grandes como en pequeñas arterias, y la disfunción endotelial parece desarrollarse con la aparición de la hipertensión (Konishi y col., 1983). La relajación dependiente del endotelio producida por la acetilcolina también está deteriorada en tejido cavernoso de las SHR y se restaura parcialmente con la administración de indometacina. El deterioro de la relajación dependiente del endotelio podría ser atribuido a la angiotensina II, al tromboxano o al anión superóxido en las arterias de las SHR o a la alta presión arterial *per se* (Rajagopalan y col., 1996; Paniagua y col., 2000).

Hiperlipidemia

Existen evidencias clínicas que muestran una elevación de la prevalencia de la DE relacionada con la presencia de hipercolesterolemia (Roumeguère y col., 2003). Sin embargo, el MMAS mostró que el riesgo de DE disminuye cuando se elevan los niveles de HDL (Feldman y col., 1994). La influencia de la aterosclerosis en la génesis de la disfunción eréctil se ha evaluado en animales de experimentación

sometidos a una dieta con alto contenido en colesterol y triglicéridos (Azadzi y col., 1992). La aterosclerosis puede producir disfunción eréctil debido a la generación de lesiones arteriales obstructivas a nivel de la arteria pudenda interna, peneana común y arterias cavernosas. Esta obstrucción arterial mantenida provoca una situación de isquemia fenotípica del músculo trabecular (Moreland y col., 1995). Además, la hipercolesterolemia por sí misma puede producir impotencia por lesión del endotelio de los espacios lacunares. Así, la aterosclerosis favorece la aparición de DE por lesión obstructiva, hipoxia crónica con fibrosis y disfunción endotelial. Se ha visto que la vía del NO/GMP_c se ve comprometida en la hipercolesterolemia por un incremento de la producción de anión superóxido por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Shukla y col., 2005) o de los niveles plasmáticos de dimetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor endógeno de la NOS (Kang y col., 2005).

Tabaquismo

Las conclusiones de un estudio sobre la influencia del tabaco en el desarrollo de DE fueron que están íntimamente relacionados tabaco, aterosclerosis, enfermedad coronaria y DE (Mcvarry y col., 2001). Además, el tabaco multiplicaría por 2 la posibilidad de presentar DE moderada o severa. Para estos autores, el tabaco provocaría una disfunción endotelial que afectaría a la relajación del músculo liso sinusoidal disminuyendo la rigidez peneana. Esta disfunción del endotelio peneano ocasionada por el tabaco estaría fuertemente asociada con alteraciones del endotelio en otros lugares del organismo (Mcvarry y col., 2001). El hábito fumador puede causar estos efectos al reducir la biodisponibilidad del NO a través de la generación de estrés oxidativo y la formación de superóxido y peroxinitrito (Burke y col., 2003). Además de favorecer la presencia de aterosclerosis y asociarse a otros factores que comprometen la función endotelial, el tabaquismo se asocia con la DE en varones jóvenes sin antecedentes de enfermedad cardiovascular, hipertensión diabetes o neuropatía (Mirone y col., 2002, He y col., 2007). De hecho, el riesgo de DE se relaciona directamente con el número de cigarrillos fumados por día y la asociación entre el hábito de fumar, mientras que la DE era aún más frecuente en los pacientes con diabetes (He y col., 2007).

Diabetes Mellitus (DM)

La DM es un trastorno endocrino metabólico crónico que afecta a diferentes órganos y tejidos y se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en sangre: hiperglucemia. Puede producirse por una disminución o ausencia total de producción de insulina por las células β -pancreáticas (DM tipo 1) o por una resistencia a la acción de la insulina en los tejidos diana de esta hormona (DM tipo 2). Mientras que en el año 1995 se calculó que más de 135 millones de personas en todo el mundo (un 4% de la población total) eran diabéticos, en 2030 se estima que esta prevalencia aumentará hasta

alcanzar la cifra de 366 millones de personas con diabetes (un 5,4% de la población mundial) (King y col., 1998; Wild y col., 2004). En España se estima que entre un 6% y un 10% de la población es diabética, lo que supone que alrededor de 2,1 millones de españoles son diabéticos (Abadal y col., 2000), siendo la diabetes la tercera causa de mortalidad entre las mujeres y la séptima entre los varones (Bosch y col., 2002). La DM incrementa el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria, accidentes cerebrovasculares y enfermedad arterial periférica, además de obesidad, aterosclerosis y dislipemia, microalbuminuria, disfunción endotelial, hiperagregabilidad plaquetaria y presencia de anomalías en el proceso de coagulación (Sowers y col., 2001).

La asociación entre la diabetes y el desarrollo de la DE está en la literatura desde 1798 (McCulloch DK y col., 1980). De hecho, la diabetes representa uno de los principales determinantes de DE (Martin-Morales y col., 2001), por esta razón, veremos esta asociación con detalle más adelante.

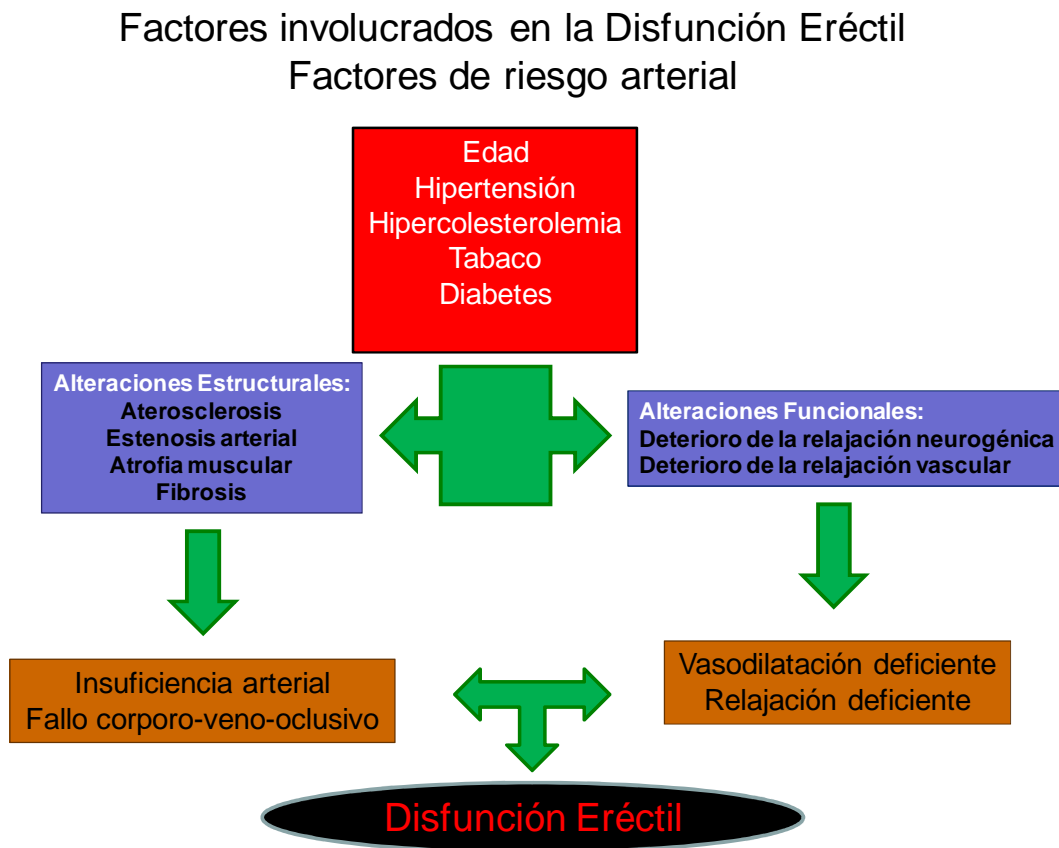


Fig. 10. Mecanismos que llevan a la insuficiencia arterial y a la disfunción eréctil. Factores de riesgo arterial que participan en alteraciones macro y microvasculares promoviendo la isquemia y un bajo aporte de O₂. El cuerpo cavernoso se vuelve fibrótico y menos expansible provocando una disfunción veno-oclusiva y disfunción eréctil.

Disfunción eréctil asociada a la diabetes mellitus (DEDM)

La DE es una de las complicaciones más comunes de la DM. Dependiendo de la severidad y duración de la DM (Bacon y col., 2002), la prevalencia de la DE es del 20% al 85% entre estos pacientes (McCulloch y col., 1980; Schiavi y col., 1993; Selvin y col., 2007) y se ha visto que la prevalencia de la DE es más elevada en los hombres con diabetes que son mayores de 50 años, casi el doble que en los hombres de la misma edad sin diabetes (45.8% vs 24.1%). De hecho, en un estudio realizado por Johannes y col., (2000), se demostró que para cada década de vida, la incidencia de DE era mayor en los hombres diabéticos que en los que no son diabéticos y que la DE ocurre a edad más temprana en pacientes diabéticos que en aquellos que no lo son. El incremento de la prevalencia de DE en los pacientes diabéticos afecta tanto a hombres con diabetes de tipo 1 como con diabetes de tipo 2 (McCulloch y col., 1980; Feldman y col., 1994; Bancroft y col., 1996; Klein y col., 1996), aunque se refiere una mayor incidencia en los pacientes con diabetes tipo 1 (Fedele y col., 2000). Dentro de los pacientes diabéticos, los factores que aumentan la probabilidad de sufrir disfunción eréctil son: mal control de la glucemia, mayor duración de la diabetes, mayor edad, hábito fumador y presencia de enfermedad cardiovascular y otras complicaciones de la diabetes (Bortolotti y col., 1997; Enzlin y col., 2003). Se han planteado diferentes mecanismos para explicar el desarrollo de la DE en el paciente diabético: alteraciones vasculares (Saenz de Tejada y col., 1989; McVeight y col., 1992; Azadzi y col., 1991; Mass y col., 2002; Kaya y col., 2006), alteraciones neurológicas (Richardson y col., 2002; Romero y col., 1997; Sasaki y col., 2003), alteraciones del músculo liso (Richardson y col., 2002) y alteraciones psicológicas (De Berardis y col., 2003). Para su mejor comprensión se analizan por separado, aunque es más probable una alteración vasculo-mio-neuro-endotelial (Burnett, 1997). La enfermedad vascular es, probablemente, la alteración más determinante en el proceso que provoca la DE en los pacientes diabéticos. Además de un deterioro de la función vascular sistémica que pueda comprometer el aporte sanguíneo al pene, las alteraciones funcionales de las estructuras vasculares que componen el tejido eréctil constituyen un mecanismo fundamental en la patogénesis de la DE diabética. En los hombres diabéticos se observó una alta incidencia de lesiones fibróticas de la arteria cavernosa, con proliferación de la íntima, calcificación y estenosis luminal (El-Sakka., 2011). La diabetes y la aterosclerosis producen lesiones ultraestructurales con reducción del porcentaje de fibras musculares lisas, aumento de los depósitos de colágeno, engrosamiento de la membrana basal y alteraciones del endotelio lacunar (Meuleman y col., 1991).

Fisiopatología de la disfunción eréctil diabética

La diabetes provoca una serie de cambios fisiopatológicos que afectan a la función psicológica, el funcionamiento del sistema nervioso central, la secreción de andrógenos, la actividad neurológica periférica, la contractilidad del músculo liso y la función endotelial (Dunsmuir y col., 1996). Cada una de estas alteraciones por separado o varias simultáneamente, pueden ser responsables de la disfunción eréctil diabética.

Deterioro funcional

Como se ha mencionado anteriormente, la vasodilatación de las arterias peneanas y la relajación del músculo liso cavernoso son procesos fundamentales para la función eréctil, que se ven claramente afectados por la diabetes. La vasculopatía y neuropatía son complicaciones comunes en el cuerpo cavernoso del paciente diabético, por ello la base orgánica de la DE en hombres diabéticos se debe fundamentalmente a alteraciones neurológicas y vasculares (Saenz de Tejada y col., 1988; Saenz de Tejada, 1989). Además, este hecho se ha evidenciado consistentemente en tejido cavernoso de pacientes diabéticos y de modelos de animales de diabetes (Saenz de Tejada y col., 1989, Azadzoi y col., 1992; Angulo y col., 2006; Angulo y col., 2009), y este deterioro de la vasodilatación endotelial y neurogénica también se ha observado en las arterias de resistencia del pene procedentes de pacientes diabéticos (Angulo y col., 2003b; Angulo y col., 2009). En concreto, en la relajación endotelial de las arterias peneanas humanas, no sólo se ve afectada la respuesta mediada por el NO, sino que la diabetes causa, además, una reducción de la relajación mediada por el EDHF (Angulo y col., 2003b). Estudios realizados ponen de manifiesto de que el desarrollo de la DE en los pacientes diabéticos está ligado al deterioro de la función endotelial asociada a la diabetes (De Angelis y col., 2001; Pegge y col., 2006). Existen diversos mecanismos fisiopatológicos asociados a la diabetes que contribuyen a la alteración funcional del tejido eréctil, y, por tanto, a la DE. Entre estos mecanismos fisiopatológicos se encuentran:

Profundo deterioro de la vía del NO/GMP_c

Se conoce desde hace tiempo el hecho de que el tejido cavernoso de los pacientes diabéticos con DE presenta un déficit de las respuestas mediadas por NO respecto al tejido de los pacientes no diabéticos con DE (Saenz de Tejada y col., 1989). Sin embargo, ha sido recientemente cuando se ha constatado que, a su vez, el tejido eréctil de los pacientes no diabéticos con DE también manifiesta un deterioro de la vía de relajación mediada por NO/GMP_c con respecto al tejido eréctil de hombres sin DE

(Angulo y col., 2010a), lo que demuestra, por tanto, un mayor deterioro en el tejido eréctil diabético. Es decir, el deterioro de la vía NO/GMP_C en el tejido eréctil, tanto arterial como cavernoso, de los pacientes diabéticos con DE es más acusado que en otros pacientes con DE (Angulo y col., 2003b; Angulo y col., 2009; Angulo y col., 2010a). Este deterioro de la vía de NO/GMP_C puede ser responsable, no sólo de la patogénesis de la DE, sino también de la menor respuesta a la terapia convencional con inhibidores de la PDE5, que actúan sobre esta vía (Angulo y col., 2010a).

Ya que la estimulación de la síntesis de GMP_C con donadores de NO, no suele verse afectada en la diabetes, el profundo deterioro en la vía NO/GMP_C puede deberse a una reducción de la síntesis o la biodisponibilidad de NO. Diversos trabajos de investigación han sugerido, en modelos de animales con diabetes, una disminución del contenido de las enzimas responsables de la síntesis de NO en el tejido cavernoso, tanto de la isoforma neuronal (nNOS) (Vernet y col., 1995; Podlasek y col., 2001) como de la endotelial (eNOS) (Akingba y col., 2001; Bivalacqua y col., 2003). Además, aunque se ha considerado su concentración intracelular un paso no limitante de la síntesis de NO, se ha evidenciado una reducción de los niveles plasmáticos de L-arginina (substrato de la NOS) en las ratas diabéticas, y la vasodilatación endotelial *in vivo* aumenta cuando se administra L-arginina de forma aguda (Angulo y col., 1998). Bivalacqua y col. (2001) evidenciaron un aumento de la expresión de la enzima arginasa (la isoforma tipo II, específicamente) en el cuerpo cavernoso procedente de pacientes diabéticos. Este hecho podría constituir una posible explicación para la reducción de la disponibilidad de L-arginina en diabetes, ya que un aumento de la actividad arginasa, limitaría la disponibilidad de sustrato para la síntesis de NO.

Incremento del estrés oxidativo

Las evidencias experimentales sugieren que el estrés oxidativo causado por la hiperglucemia desempeña un importante papel en la patogenia de la DE en diabetes, siendo otro mecanismo importante en la disfunción endotelial asociada a la diabetes. El estrés oxidativo puede ser definido como un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis intracelular de los procesos de oxidación/reducción, es decir, entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente las moléculas reactivas o reparar el daño resultante. Este desequilibrio se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o por deficiencia de los mecanismos antioxidantes, conduciendo al daño celular. En diabetes, parece claro que la generación de las ROS experimenta un significativo aumento. El anión superóxido (O₂⁻) es una forma reactiva del oxígeno que también puede generar otras ROS. El superóxido reacciona con el NO, causando una marcada reducción de la actividad biológica del mismo

(Gryglewski y col., 1986), para formar peroxinitrito (ONNO^-) que, a su vez, es capaz de alterar la función de una variedad de enzimas celulares (Beckman y col., 1996). En particular, el peroxinitrito puede alterar la actividad catalítica de la eNOS en células endoteliales y la guanilil ciclasa en células musculares lisas vasculares. Como resultado, el peroxinitrito reduce tanto la producción de NO como la capacidad de respuesta de los tejidos diana al NO (Zou y col., 2002; Munzel y col., 2005). El aumento de la producción de las especies reactivas de oxígeno también puede influir en el estado redox de la eNOS y de co-factores críticos, incluyendo la tetrahidrobiopterina (BH_4). La pérdida de BH_4 produce un desacoplamiento de la eNOS y promueve la producción de superóxido, en lugar de NO (Guzik y col., 2002). De hecho, la adición de peroxinitrito causa una inhibición de las respuestas mediadas por NO en el cuerpo cavernoso de conejo (Khan y col., 2001), mientras que el tratamiento con la enzima superóxido dismutasa (SOD), que detoxifica el superóxido, mejora la relajación neurogénica y endotelial en el cuerpo cavernoso de conejos diabéticos (Khan y col., 2001). El tratamiento con diversos antioxidantes naturales potencia la relajación mediada por NO en el músculo liso peneano de animales diabéticos y mejora la función erétil en estos animales (Keegan y col., 1999; Keegan y col., 2001; Gocmen y col., 2000; De Young y col., 2003). El tratamiento con un antioxidante sintético también demostró revertir la DE en ratas diabéticas a la vez que potenció las respuestas mediadas por la vía del NO/GMP_c en cuerpo cavernoso y arterias peneanas humanas (Angulo y col., 2009), reforzando el papel del estrés oxidativo en el desarrollo de disfunción erétil en diabetes. No existe un consenso sobre la fuente de ROS en diabetes y, seguramente, varias fuentes de ROS contribuyen al aumento de estrés oxidativo en el tejido erétil diabético. Una fuente de ROS puede ser la glicación de proteínas, que se incrementa en diabetes por la exposición a altas concentraciones de glucosa. De hecho, la hemoglobina glicada, un producto intermedio de la glicación, inhibe la relajación dependiente de endotelio en el cuerpo cavernoso de rata mediante la generación de superóxido (Cartledge y col., 2000). Por otra parte, los productos finales de la glicación (AGEs), que se acumulan en el tejido erétil de los pacientes diabéticos (Seftel y col., 1997), a través de sus receptores específicos (RAGEs) aumentan el estrés oxidativo intracelular (Wautier y col., 2001) e inhiben la actividad de la eNOS (Xu y col., 2003). Es más, los AGEs se han mostrado como neurotóxicos de los nervios nitrérgicos peneanos de rata (Xu y col., 2003). La participación del proceso de la glicación de proteínas en la fisiopatología de la disfunción erétil diabética se sustenta también en el hecho de que el tratamiento con aminoguanidina, un inhibidor de la formación de AGEs, mejora la relajación dependiente de endotelio y la función erétil en las ratas diabéticas (Cartledge y col., 2001; Usta y col., 2003).

La NADPH oxidasa es una enzima responsable de la generación de aniones superóxido en el tejido vascular y se ha sugerido su participación en la patogénesis de la DE asociada a situaciones patológicas en las que se produce un aumento de esta actividad enzimática, entre las que se incluye la

diabetes (Jin y col., 2008). En este sentido, se ha demostrado un aumento de la expresión de NADPH oxidasa en el cuerpo cavernoso de conejos diabéticos (Shukla y col., 2009). Además de estas fuentes de ROS, la cadena respiratoria mitocondrial o el desacoplamiento de la actividad NOS probablemente también contribuyen al incremento del estrés oxidativo en la diabetes. En pacientes diabéticos tipo 2, se ha observado un aumento de la activación oxidativa en los monocitos circulantes de los pacientes que presentaban DE y se reduce con terapia antioxidante (Morano y col., 2007).

Alteraciones de los mecanismos de contracción del músculo liso peneano

Aunque existen numerosas demostraciones del deterioro de la capacidad vasodilatadora y relajadora del tejido eréctil diabético, las evidencias de un aumento de las vías que promueven la contracción no son tan abundantes. Sin embargo, se ha descrito que existe un aumento de las respuestas contráctiles a la endotelina-1 (ET-1), un péptido con una capacidad constrictora muy potente que también tiene influencia sobre la regulación celular de endotelio y músculo liso, en tejido cavernoso de ratas y conejos diabéticos (Wingard y col., 2007; Chang y col., 2003). Este efecto podría estar relacionado con un incremento de la expresión de sus receptores en el tejido cavernoso de los animales diabéticos, aunque en un principio el aumento observado fue del subtipo ET_B (Sullivan y col., 1992), posteriormente se reveló un aumento del subtipo ET_A (Chang y col., 2003). Por otra parte, se ha observado un aumento de ET-1 en el pene de rata diabética que está relacionado con un aumento de la apoptosis en el tejido cavernoso de estos animales (Jesmin y col., 2006).

Por otro lado, se ha propuesto que la contracción podría verse favorecida por una potenciación de las vías de sensibilización al calcio, que facilitan el sostenimiento de la respuesta contráctil. Precisamente, el aumento de expresión/actividad de dos enzimas implicadas en estas vías, la proteína quinasa C (PKC) y la Rho-quinasa, se ha propuesto como responsable del aumento de la contracción a ET-1 (Wingard y col., 2007; Chang y col., 2003). En lo que respecta al tono del músculo liso, la PKC puede regular canales iónicos o la fosforilación de diferentes sustratos para facilitar la contracción (Walsh y col., 1994; Lee y col., 1994). El incremento de la actividad de la PKC en diabetes está ampliamente documentado (Inoguchi y col., 1992; Koya y col., 1993). El aumento de la actividad de la PKC puede estar relacionado con el estrés oxidativo asociado a la diabetes, ya que su inducción por alta glucosa en células cavernosas de rata (específicamente PKC β II) se previene tratando con vitamina E (Ganz y col., 2000). El exceso de la actividad PKC en el tejido eréctil podría contribuir a la disfunción endotelial asociada a la diabetes, ya que la inhibición de la PKC recupera la relajación dependiente de endotelio en el cuerpo cavernoso de animales (Nangle y col., 2003) y pacientes diabéticos (Angulo y col., 2006). Una potenciación de la vía RhoA/Rho-quinasa también se ha relacionado con el desarrollo de la DE diabética. Además de su participación en la respuesta contráctil como se ha mencionado, el aumento

de Rho-quinasa en tejido cavernoso de las ratas diabéticas causa la reducción de la actividad de la eNOS (Bivalacqua y col., 2004). Recientemente, se ha mostrado que la administración oral crónica de un inhibidor de la Rho-quinasa previene el aumento de apoptosis en el tejido cavernoso y recupera la función eréctil en ratas diabéticas (Li y col., 2011).

Alteraciones estructurales

Con respecto a los pacientes no diabéticos, los pacientes diabéticos presentan una reducción del ratio entre la presión sanguínea de la arteria dorsal del pene y la de la arteria braquial (Virag y col., 1985). Este dato sugiere una insuficiencia arterial peneana. De hecho existe una alta prevalencia de insuficiencia arterial peneana entre los pacientes diabéticos con DE. Se han observado alteraciones estructurales del tejido cavernoso en pacientes diabéticos, incluyendo una reducción del contenido de células musculares lisas, un mayor acúmulo de fibras de colágeno, un engrosamiento de la lámina basal y una pérdida de células endoteliales (Mersdorf y col., 1991). La pérdida de elasticidad de los sinusoides del pene se asocia con un aumento del depósito de colágeno y una disminución de las fibras, como se puede ver en la diabetes, hipercolesterolemia, enfermedades vasculares, lesiones del pene, o la vejez (Cerami y col., 1987; Hayashi y col., 1987). Estas alteraciones se aprecian también en el tejido eréctil de pacientes con disfunción eréctil debida a causas diferentes a la diabetes, pero en un grado menos severo. En un modelo animal, de DE vasculogénica, Nehra y col., (1998) demostraron que la capacidad de expansión del cuerpo cavernoso se correlaciona con el contenido de músculo liso y puede ser utilizado para predecir la histología trabecular. Otros estudios muestran un aumento de la apoptosis y una pérdida de la integridad del endotelio en el tejido cavernoso de los pacientes diabéticos, unas alteraciones que se correlacionan con menor respuesta a la inyección intracavernosa y con una reducida liberación de NO (Costa y col., 2009). Las alteraciones estructurales del tejido cavernoso también se desarrollan en los modelos animales de diabetes, donde se observa una pérdida de músculo liso trabecular y de células endoteliales, mientras que aumenta la matriz extracelular dando lugar una fibrosis (Simopoulos y col., 2001; Ahn y col., 2005; De Young y col., 2008; Kovanecz y col., 2009). Este proceso fibrótico se produce por un aumento de apoptosis de las células endoteliales y musculares que van siendo sustituidas por las fibras colágenas cuya producción se incrementa por la expresión de factores pro-fibróticos como el TGF β -1. El tipo de colágeno más frecuente en el tejido cavernoso es el tipo III, de fibras más delgadas y distensibles, que representa el 60% del total, con predominio sobre las de tipo I, de fibras más gruesas y firmes, que se encuentran en proporción de un tercio, con respecto a la anterior. La relación de colágeno III/I se reduce con la edad, la presencia de diabetes y de vasculopatía, y altera las características fibroelásticas del tejido eréctil. La fibrosis finalmente provoca el fallo del mecanismo corporo-veno-oclusivo. Aunque la secuencia de eventos no

está completamente dilucidada, la aparición de alteraciones estructurales podría ser consecuencia del deterioro funcional previo que al impedir la correcta oxigenación del tejido cavernoso provocaría un estado de hipoxia y de reducción de factores anti-fibróticos (NO, PGE₁,...) que desencadenaría la respuesta fibrótica del tejido eréctil. Se puede añadir que la sobre-expresión de colágeno provoca la disrupción del mecanismo veno-oclusivo con un atrapamiento incompleto de la sangre. Todos estos eventos comprometen la relajación completa de los cuerpos cavernosos y determinan que se produzca el fallo eréctil (Nagao y col., 1997; Hackin y col., 1996).

Alteraciones neuronales

Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que el sistema nitrérgico es esencial para la erección peneana (Anderson y col., 1995). La neuropatía es una complicación de la diabetes que también se ha relacionado con el desarrollo de DE. Se ha observado que los pacientes diabéticos que presentan DE muestran una reducción de la conducción nerviosa más frecuentemente que los que no tienen DE (Hecht y col., 2001). Tanto en modelos de DE diabética, como de DE neuropática, se observa un aumento de marcadores de apoptosis en el nervio cavernoso (McVary y col., 2006). Celtek y col., (1999) observaron en un estudio inmunohistoquímico en muestras de pene de ratas diabéticas, que los nervios nitrérgicos degeneran, mientras que los nervios noradrenérgicos permanecen intactos y demuestran que la reducción de la actividad de la nNOS y su expresión proteica se debe a una degeneración nitrérgica selectiva en el pene de ratas diabéticas. En diabetes, se observa, de hecho, una profunda reducción de las respuestas nitrérgicas en el cuerpo cavernoso y las arterias peneanas humanas (Angulo y col., 2009; Angulo y col., 2010a). El deterioro selectivo de esta vía vasodilatadora neurogénica sin modificar la neurotransmisión simpática podría favorecer un desequilibrio a favor de las respuestas neurogénicas contráctiles.

Alteraciones hormonales

Varias evidencias clínicas revelan una elevada prevalencia de hipogonadismo en los hombres diabéticos, con niveles bajos de testosterona total y libre (Kapoor y col., 2007). Esta disminución de los niveles de testosterona responde al restablecimiento del control glucémico y está relacionada con la resistencia a la insulina en los pacientes diabéticos con DE (El-Sakka y col., 2009). Aunque este hecho parece claro para la diabetes tipo 2, no lo es tanto para la diabetes tipo 1, ya que algunos estudios muestran niveles normales de testosterona en estos pacientes, niveles por encima de los pacientes con diabetes tipo 2 (Tomar y col., 2006; Chandel y col., 2008). La presencia de hipogonadismo puede obviamente ejercer un impacto negativo sobre la función eréctil. En este sentido, la presencia de DE se

asoció con niveles más bajos de testosterona en una población analizada de pacientes diabéticos tipo 2 (Kapoor y col., 2007). Además, en modelos animales de diabetes, que se asocian habitualmente a bajos niveles de testosterona, la administración de testosterona no sólo mejora la función eréctil (Skakkebaek y col., 1981; Garban y col.; 1985), sino que también aumenta la respuesta a sildenafil, un efecto este último relacionado con la modulación de la expresión de la PDE5 ejercida por la testosterona (Zhang y col., 2006).

Anatomía de la vejiga urinaria

La vejiga urinaria es un hueco músculo-membranoso que forma parte del tracto urinario y que recibe la orina de los uréteres, la almacena y la expulsa a través de la uretra al exterior del cuerpo durante la micción (fig. 11 y fig. 12).

La vejiga urinaria está compuesta de dos partes:

- El cuerpo es la parte donde se recoge la orina; está compuesto de varias capas de tejido muscular liso, el cual es conocido como músculo detrusor, y, en su cara interna, por tejido epitelial de transición (urotelio) que permite el estiramiento sin degradarse.
- El cuello, también llamado uretra posterior, es la extensión tunelizada del cuerpo que lo conecta con la uretra. Mide entre 2 cm y 3 cm de largo y está compuesto de músculo detrusor entremezclado con grandes cantidades de músculo elástico.

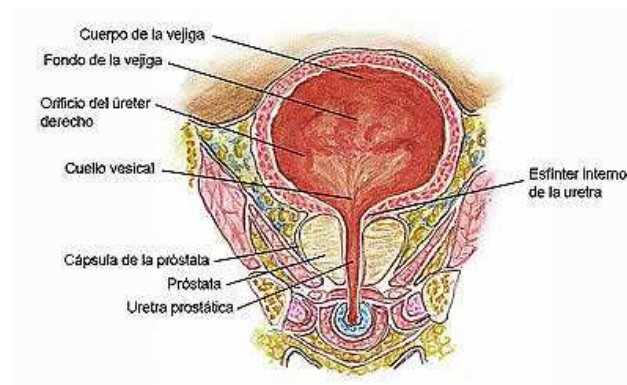


Fig. 11. Vejiga urinaria masculina (www.oncoguia.eu/tipos/vejiga/html)

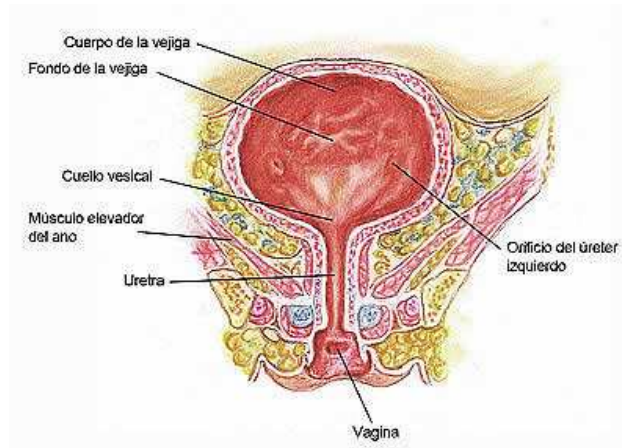


Fig. 12. Vejiga urinaria femenina (www.oncoguia.eu/tipos/vejiga/html)

La uretra es un conducto que conduce la orina hasta el exterior. En el hombre es de cierta longitud, con una porción peneana y una porción extrapeneana. En cambio, la uretra femenina es corta y desemboca cerca del orificio vaginal. En la uretra distinguimos dos esfínteres:

- El esfínter uretral interno está formado por haces musculares que pasan de un lado a otro de la uretra, pero no constituyen un círculo completo a su alrededor.
- El esfínter uretral externo está formado por un músculo estriado que se ubica en un sector de la uretra y está innervado por el nervio pudendo, que proviene de la médula espinal, de una zona medular llamada núcleo de Onuf. La placa mioneural conecta el nervio pudendo con la uretra, y el neurotransmisor implicado es la acetilcolina.

Fisiología de la actividad vesical

El mecanismo del proceso de micción, básicamente, consiste en:

- Llenado progresivo de la vejiga hasta que la tensión en sus paredes sobrepasa su valor de umbral.
- Superado el valor umbral, se activa un reflejo nervioso (reflejo de micción) que produce la micción o el deseo consciente de orinar.

Fases de la micción

Fase de llenado y almacenamiento

Fase de llenado: la vejiga se relaja y va aumentando de tamaño según almacena cantidades crecientes de orina. La primera sensación del deseo de orinar aparece como respuesta del sistema nervioso al estiramiento de la pared vesical cuando se han almacenado aproximadamente unos 200 cc de orina. La vejiga puede seguir llenándose hasta acumular unos 350-450 cc de orina. La

capacidad de llenar y almacenar la orina de forma apropiada exige un esfínter (músculo que controla la salida de la orina desde la vejiga) funcional y un músculo de la pared de la vejiga (detrusor) estable.

Fase de almacenamiento: El almacenamiento de la orina depende de un buen funcionamiento de la vejiga, de los tejidos musculares, del soporte del suelo pélvico y del sistema nervioso. Además, la persona necesita tener la capacidad física y psicológica de reconocer y responder de forma apropiada a la sensación del deseo de orinar.

Fase de vaciado

La fase de vaciado requiere la capacidad del músculo detrusor de la vejiga de contraerse de tal forma que fuerce la orina a salir de la vejiga. Además, es necesaria la relajación del esfínter simultáneamente para permitir la salida de la orina.

El proceso completo para orinar de forma normal (llenado-almacenamiento y vaciado) es complejo, y la capacidad de controlar la micción se puede ver alterada en diferentes fases del proceso por diferentes anomalías, lo que provoca en determinadas condiciones incontinencia urinaria.

Inervación de la vejiga urinaria

En el mecanismo de control del aparato urinario convergen las dos grandes partes del sistema nervioso: la parte vegetativa o autónoma y la somática o voluntaria. A su vez, el sistema vegetativo se compone de los nervios simpáticos o adrenérgicos y parasimpáticos o colinérgicos. La inervación simpática se transmite a través de los nervios hipogástricos conectados con el segmento lumbar L2 de la medula espinal y controla principalmente la función vascular de la vejiga, teniendo poca relación con la contracción de la misma. Algunas fibras sensitivas también se localizan en dichos nervios simpáticos, los cuales participan en la transmisión de la sensación de repleción y dolor que aparece en ocasiones en el cuello vesical. Así mismo, la inervación de las fibras parasimpáticas se da a través de los nervios pélvicos que alcanzan la médula espinal desde las raíces sacras, principalmente desde los segmentos S2 y S3. Dichos nervios comprenden fibras sensitivas y motoras. Las primeras se encargan de detectar el grado de distensión de la pared vesical, siendo especialmente importantes en la detección de las señales de distensión provenientes de la uretra posterior, debido a que dichas señales desencadenan los reflejos del vaciado vesical. Por otro lado, las fibras motoras inervan el músculo detrusor y son las encargadas de conducir los potenciales de acción que producirán la contracción o la distensión de dicho músculo. Las fibras nerviosas somáticas también se originan desde los segmentos S2 y S3,

principalmente, llegando al esfínter externo de la vejiga a través del nervio pudendo. De esta manera controlan a voluntad las fibras estriadas de dicho esfínter (fig. 13).

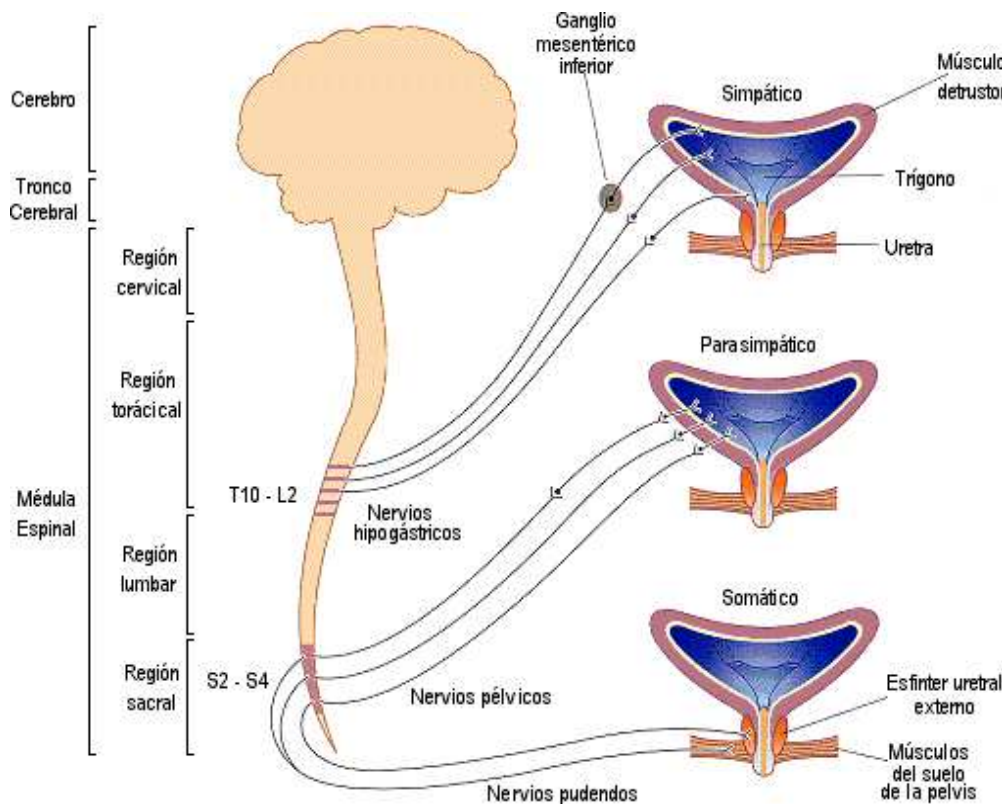


Fig. 13. Inervación de la vejiga. Sistema parasimpático: Centro de la micción S2-S4. Nervios pélvicos (preganglionares) y células ganglionares en pared vesical. Sistema simpático: Centro motor simpático T10 -L2. Nervio hipogástrico y fibras postganglionares en vejiga. Inervación motora somática: Desde el asta anterior de la médula espinal: Niveles S2-S4 formando el nervio pudendo, esfínter estriado, uretra y músculo del suelo pélvico. (Carretero, 2004)

Receptores implicados en el control de la vejiga urinaria

Receptores muscarínicos

Se han identificado hasta 5 subtipos de receptores muscarínicos denominados M1, M2, M3, M4 y M5 tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en los tejidos periféricos. Los receptores muscarínicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Están ampliamente distribuidos en el organismo y la mayoría de los tejidos tienen más de un subtipo. Los receptores muscarínicos M1 se localizan en glándulas salivares, corazón, cerebro y en los ojos; los receptores M2 están distribuidos en vejiga, tracto gastrointestinal, corazón, cerebro y en los ojos; los receptores M3 se

localizan en vejiga, tracto gastrointestinal, glándulas salivares, corazón, cerebro y ojos; los receptores M4 en cerebro y ojos y el subtipo M5 en corazón, cerebro y ojos (Abrams y col., 2006). A nivel del tracto urinario predominan los receptores M2 y M3, en una relación de 3:1. La contracción del músculo detrusor se debe fundamentalmente a los efectos de la acetilcolina sobre los receptores M3 ya que aunque los receptores M2 son predominantes en la vejiga urinaria y anejos, los receptores M3 son los más importantes desde el punto de vista funcional y su estímulo es el responsable directo de la contracción del músculo detrusor (Chapple y col., 2002). Aunque ambos subtipos están acoplados a proteínas G, sus vías de transducción de señales son diferentes (Chess, 2002). La estimulación de los receptores M3 produce la contracción del detrusor a través de la hidrólisis de los fosfoinosítoles (IP_3), aunque también se ha sugerido una implicación de canales de cationes no selectivos, del ión calcio y de la activación de la Rho-quinasa. Los resultados de distintos estudios experimentales sugieren que la contracción mediada por receptores M3 en el músculo detrusor humano es dependiente de la entrada de calcio a través de los canales lentos de calcio y a la activación de la proteína quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) que, como consecuencia, fosforila la cadena ligera de la miosina reguladora de 20KDa y de ese modo se inicia la contracción (Somlyo y col., 1994). Sin embargo, además de este mecanismo dependiente de la MLCK, la contracción del músculo liso también se puede inducir por la inhibición de la enzima fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, un mecanismo que también es sensible al Ca^{2+} a través de la fosforilación de la subunidad por la Rho-quinasa (ROCK) (Kimura y col., 1996; Schmidt y col., 1999). Todos los subtipos de receptores muscarínicos han sido detectados en el urotelio y en la capa suburotelial en el humano (Bschleipfer y col., 2007). La activación de los receptores muscarínicos de las células uroteliales da lugar a liberación de ATP que activa fibras nerviosas aferentes capaces de alterar la excitabilidad nerviosa a este nivel comportándose como un transmisor neuromuscular excitador (Westfall y col., 1983; de Groat., 2004). Además, en cultivos de células uroteliales, el bloqueo de los receptores muscarínicos con atropina inhibe la liberación de ATP mediada por la distensión que desencadena el reflejo de micción (Andersson., 2007).

Receptores adrenérgicos

La vejiga urinaria también tiene innervación simpática y, se han identificado tres subtipos de receptor β adrenérgico (β_1 , β_2 y β_3) en el detrusor y urotelio (Andersson y col., 2004a; Michel y col., 2006; Otsuka y col., 2008). Los receptores β_3 adrenérgicos son predominantes, con más del 97% del total de ARN mensajero del receptor β adrenérgico (Yamaguchi, 2002), y se considera que es el subtipo principal implicado en la relajación del detrusor en humanos (Wuest y col., 2009). Durante la fase de llenado vesical, predomina la estimulación de la función simpática. Se libera noradrenalina de

las terminaciones nerviosas, lo que induce predominantemente la activación del receptor β_3 adrenérgico en la musculatura de la vejiga y, por tanto, la relajación del musculo liso de la misma, mediante aumento de las concentraciones de AMPc (Frazier y col., 2008). Estos receptores están localizados, además de en la vejiga, en la próstata, el colon, el músculo esquelético, el corazón y el tejido adiposo y participan en las funciones metabólicas de las catecolaminas endógenas, como lipólisis, termogénesis, procesos de motilidad del tracto gastrointestinal y urinario (Yamaguchi, 2002) (fig.14).

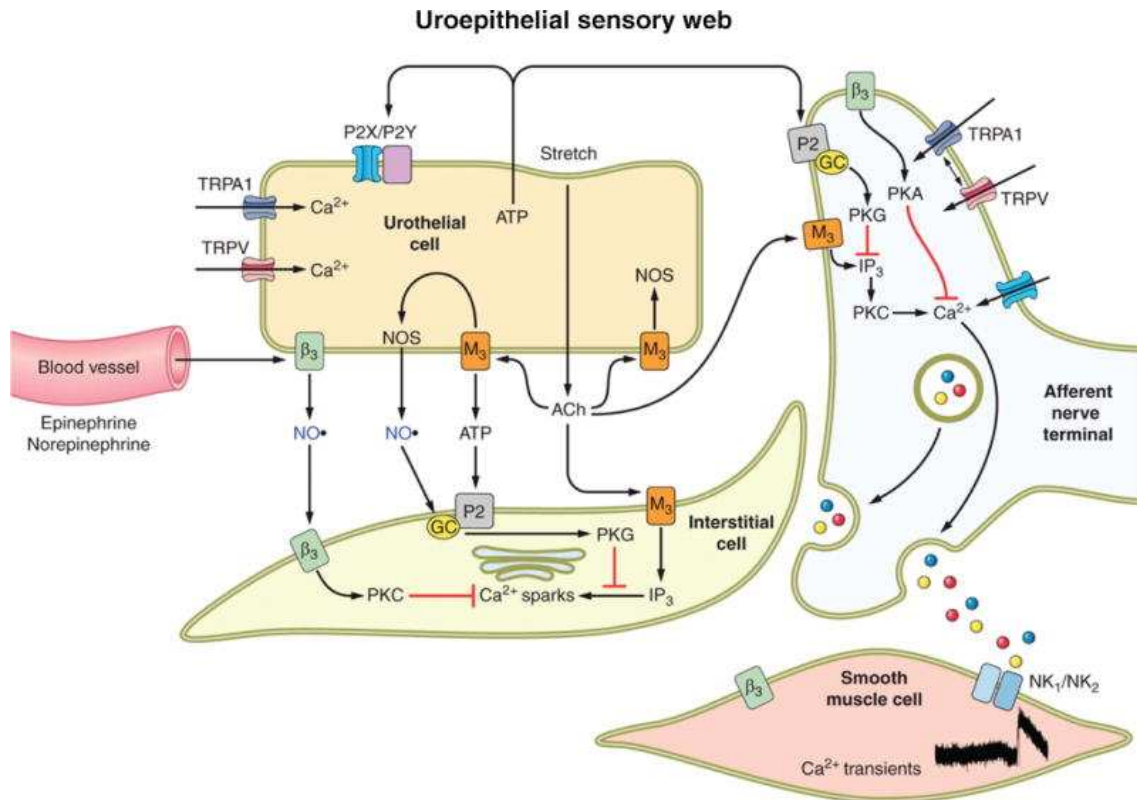


Fig. 14. Modelo hipotético que representa las posibles interacciones entre los nervios aferentes de la vejiga, células uroteliales, células musculares lisas, células intersticiales, y vasos sanguíneos. Las células uroteliales también pueden ser dianas para los transmisores liberados de los nervios u otros tipos de células. Las células uroteliales pueden ser activados por cualquier mecanismo autocrino (la autorregulación) o por mecanismos paracrinós (liberación de los nervios cercanos u otras células). El estiramiento de la vejiga libera ATP que actúa sobre los receptores P2 en el terminal aferente o en la célula intersticial y sobre los receptores P2 en la célula urotelial. El estiramiento también libera ACh que actúa sobre los receptores muscarínicos (M3) en el terminal aferente, la célula intersticial o la célula urotelial. Esta última acción puede liberar NO. La epinefrina o norepinefrina también liberan NO a partir de la célula urotelial mediante la activación de los receptores beta 3 adrenérgicos (Birder y col., 2013).

Canales iónicos en la vejiga urinaria. Papel de los K_{Ca}

La activación del músculo detrusor a través de los receptores muscarínicos o de las vías NANC parece requerir el influjo de Ca²⁺ a través de los canales L y T y la movilización del Ca²⁺ intracelular. Los antagonistas de los canales L tienen un potente efecto inhibitorio sobre el detrusor humano aislado y sobre los pacientes con hiperactividad de éste, aunque se ha visto que los bloqueantes de los canales del Ca²⁺ son menos eficaces para suprimir las contracciones mediadas por el nervio, que dependen tanto de la entrada de calcio extracelular como de la liberación estimulada de calcio intracelular desde el retículo sarcoplásmico a través de mecanismos mediados por IP₃ (Levin y col., 1995; Zderic y col., 1996; Brading 1997; Andersson y col., 2004b).

En el músculo detrusor se han identificado tres tipos de canales de K⁺: Los K_{ATP}, los BK y los SK (Andersson, 1992; Trivedi y col., 1995; Andersson y col., 2004b). Por ello, la manipulación farmacológica tanto de los canales de Ca²⁺ como del K⁺ puede conducir a una actividad contráctil espontánea reducida (Levin y col., 1991; Andersson, 1992; Trivedi y col., 1995, Brading 1997; Andersson y col., 2004b). El mecanismo de las acciones puede ser tanto la acción directa sobre el músculo liso como la acción sobre las terminaciones nerviosas aferentes cerca del urotelio (Hu y col., 1997; de Groat 1999). En trabajos previos se ha observado que la supresión de los canales SK3 causa hiperactividad de la vejiga mientras que su sobreexpresión causa el efecto contrario (Herrera y col., 2003). Los ratones con delección del gen mSlo 1 para la subunidad formadora del poro del canal BK muestran un aumento de las contracciones vesicales espontáneas y evocadas por el nervio así como una elevación pronunciada de la frecuencia urinaria (Meredith y col., 2004). También se ha demostrado que la inyección local de cDNA de hSlo en la luz vesical para aumentar la actividad de los canales BK eliminaba la hiperactividad del detrusor en ratas con obstrucción del tracto de salida vesical (Christ y col., 2001), lo que sugiere un papel importante de los canales BK en la función de la vejiga y la hiperactividad vesical. Por lo tanto, existe un interés en los canales BK como diana terapéutica en los síntomas urinarios de la vejiga (Petkov, 2011) y, además, en el desarrollo de activadores específicos de estos canales para su uso terapéutico en el tratamiento de la hiperactividad vesical (Pandita y col., 1999; Anderson y col., 2004a), ya que activadores de los BK, como el NS-8, han mostrado reducir *in vitro* la actividad contráctil miogénica espontánea de la vejiga de diferentes animales (Malyzs y col., 2004). Además, se ha observado *in vivo* una reducción de la actividad vesical después del tratamiento con NS-8, aunque en ratas normales, que no presentaban hiperactividad vesical (Tanaka y col., 2003).

Alteraciones de la función del tracto urinario

Alteraciones de la micción

Según los estudios urodinámicos los problemas miccionales se clasifican en:

- problemas en el almacenamiento que dan lugar a incontinencia
- problemas en el vaciado que dan lugar a un síndrome obstructivo.

Si falla la coordinación nerviosa que hace posible la micción se da lugar a lo que se conoce como vejiga neurógena o disfunción miccional neurógena y se producirán alteraciones de la micción, que pueden darse tanto en el almacenamiento de la orina como en el vaciado. Por tanto, en todo trastorno del tracto urinario inferior siempre se tiene que estudiar el binomio detrusor/esfínteres.

Patologías del aparato urinario

Incontinencia urinaria: Pérdida del control de la vejiga

1. Clasificación de la incontinencia urinaria:

1.1. Incontinencia urinaria de esfuerzo: Es debida a un fallo en el mecanismo de los esfínteres. Se define como el escape involuntario de orina que sucede frente a diferentes situaciones que provocan un aumento de presión en el abdomen, como pueden ser toser, reír, saltar, bailar, correr, incorporarse bruscamente, levantar un peso, bajar escaleras. Es especialmente frecuente en mujeres multiparas, por la relajación del suelo pélvico y la pérdida de ángulo entre la vejiga y la uretra.

1.2. Incontinencia de urgencia: Se define por un deseo brusco de orinar sin tiempo a ir al lavabo. Es también más frecuente en las mujeres y en la tercera edad. Cuando la incontinencia se debe a una contracción involuntaria de la vejiga, se denomina vejiga inestable y sólo se puede saber si se realiza un estudio urodinámico. La vejiga inestable tiene una clínica de tipo irritativo miccional sin infección. Actualmente se ha asociado el término de vejiga hiperactiva para distinguirse de aquella clínica de polaquiuria, urgencia o incontinencia por urgencia sola o asociadas entre sí.

1.3. Incontinencia mixta: Se denomina así cuando presenta sintomatología de incontinencia de esfuerzo y de incontinencia de urgencia.

1.4. Incontinencia de rebosamiento: Es aquella debida a una pérdida de orina por rebosamiento. En realidad no es una incontinencia, sino que debido al gran volumen de orina almacenado ésta sale.

Vejiga hiperactiva: Una afección que causa que la vejiga expulse orina cuando no tiene que hacerlo. Veremos con más detalle esta alteración de la actividad vesical en el próximo apartado.

Cistitis intersticial: Un problema crónico que causa dolor en la vejiga y urgencia de orinar.

Cáncer de vejiga.

Patología prostática: La próstata es una glándula del sistema reproductor masculino. Su situación debajo de la vejiga urinaria, envolviendo la uretra y por delante del recto, le confiere una participación mixta tanto del sistema urinario como del sistema reproductor. En el adulto la anatomía de la próstata se divide en dos partes: una zona periuretral donde se produce la hiperplasia de próstata y una zona periférica donde se origina el carcinoma. La hiperplasia prostática, enfermedad más frecuente de la próstata, es una patología benigna más frecuente en la edad avanzada. La hiperplasia de próstata está formada por la proliferación de elementos glandulares, musculares y del estroma que en su crecimiento comprimen la próstata periférica formando la llamada cápsula quirúrgica. El crecimiento de la próstata puede provocar compresión de la porción de la uretra que se encuentra por debajo de la vejiga dando lugar a síntomas irritativos, obstructivos o mixtos. Forman parte de los síntomas irritativos la necesidad urgente y premiosa de orinar incluso llegando a la incontinencia por urgencia, aumento del número de veces que se precisa orinar, tanto de día como de noche, disminución del volumen de cada micción, y la insatisfacción o persistencia de peso suprapúbico después de haber orinado.

Vejiga hiperactiva y síntomas del tracto urinario inferior (LUTS) asociados a hiperplasia benigna de próstata

Síndrome de vejiga hiperactiva (SVH)

El SHV fue definido por la *International Continence Society* (ICS) como: urgencia miccional, con o sin incontinencia de urgencia, generalmente acompañada de frecuencia y nocturia en ausencia de infección probada u otra enfermedad demostrable (Abrams y col., 2003). Estas combinaciones de síntomas sugieren hiperactividad del detrusor demostrable urodinámicamente, pero pueden ser debidas a otras formas de disfunción uretro-vesical. Estos términos pueden ser usados si no existe infección probada u otra patología. Puede afectar a ambos sexos, con predominio en las mujeres, aumenta su incidencia con la edad y altera la calidad de vida de quien la padece. La prevalencia en Europa oscila entre el 12% y el 22% en personas de 40 años o más años de edad (Milson y col., 2001). En el estudio NOBLE, la prevalencia encontrada fue del 16,5% de la población mayor de 18 años (Stewart y col., 2003). Un estudio epidemiológico realizado en España, registró una prevalencia de

sintomatología compatible con SVH, en personas de edad igual o superior a los 40 años, del 21,5% (Castro y col., 2005). El SVH tiene un efecto significativo en la calidad de vida, particularmente si se asocia con la incontinencia.

Desde el punto de vista farmacológico, el objetivo será inhibir las contracciones vesicales del músculo detrusor, disminuir la sensibilidad vesical y la frecuencia miccional, con el consecuente incremento en la capacidad de la vejiga para almacenar orina. La base del tratamiento para la vejiga hiperactiva (VH) se ha compuesto de medicamentos anticolinérgicos o antimuscarínicos, administrados por vía oral. Las terapias hormonales de reemplazo, antidepresivos tricíclicos y la desmopresina también se han utilizado para la gestión de la VH (Robinson y col., 2010). Uno de los primeros medicamentos anticolinérgicos utilizados para la VH fue la oxibutinina oral, aunque tiene los inconvenientes de la dosificación diaria múltiple y efectos secundarios molestos, como sequedad de boca y ojos, visión borrosa, estreñimiento y cognición deteriorada (Wagg y col., 2012). La oxibutinina es un agente antimuscarínico no selectivo que inhibe el efecto de la acetilcolina sobre el músculo liso. Provoca la relajación del músculo detrusor, pero no tiene efectos en la unión neuromuscular o en los ganglios autónomos. Relajando el detrusor, aumenta la capacidad de la vejiga, reduciendo la frecuencia de las contracciones involuntarias y la incontinencia (Ditropan® (oxybutynin chloride) tablets and syrup [prescribing information] Mountain View, CA: ALZA Corp; 2008). Como se ha mencionado anteriormente, los anticolinérgicos selectivos tienen relativamente más afinidad por los receptores M2 y M3, que son los más prevalentes en la vejiga (Jamshidi y col., 2011). Tratamientos más recientes incluyen el uso de mirabegron, un agonista del receptor β -3 adrenérgico, y la administración intravesical de toxina botulínica. Estos agentes evitan efectos secundarios anticolinérgicos por su mecanismo de acción alternativo. El mirabegron es el primer agonista de los receptores β 3-adrenérgico aprobado para el tratamiento de la VH (Lee y col., 2013; Vij y col., 2015). La relajación del músculo detrusor durante la fase de llenado vesical está mediado principalmente por la acción de la noradrenalina en los receptores β 1, 2, 3-adrenérgicos. La subclase β 3 parece ser más importante en la mediación de la relajación del detrusor humano y se expresa preferentemente en la vejiga urinaria (Sacco y col., 2012). Los principales sitios de acción del mirabegron son los β 3-adrenérgicos en el músculo liso del detrusor. Este agente causa la relajación del músculo detrusor durante el llenado de la vejiga e inhibe la hiperactividad del músculo (Khullar y col., 2013).

En comparación con los medicamentos anticolinérgicos, los agonistas β 3 adrenérgicos aumentan la capacidad de la vejiga sin ningún cambio en la presión de la micción o el volumen (Takasu y col., 2007).

LUTS asociados a la Hiperplasia Benigna de Próstata (HBP)

La HBP es el tumor benigno más frecuente en varones mayores de 60 años, cuya presencia está relacionada con la edad (Roehrborn y col., 2002). La próstata se encuentra aumentada de tamaño en mayor o menor medida, de forma uniforme y con una consistencia firme y elástica y está formada por la proliferación de elementos glandulares, musculares y del estroma que en su crecimiento comprimen la próstata periférica formando la llamada cápsula quirúrgica. El crecimiento de la próstata puede provocar compresión de la porción de la uretra que se encuentra por debajo de la vejiga dando lugar a síntomas irritativos, obstructivos o mixtos.

La localización anatómica de la próstata en el cuello vesical, envolviendo a la uretra, juega un papel importante en la fisiopatología de la HBP. Dos son los componentes que contribuyen a producir los síntomas relacionados con la HBP:

- **Componente estático:** Debido a la obstrucción mecánica sobre el cuello vesical que produce el agrandamiento de la próstata por la hiperplasia del tejido glandular bajo el estímulo de la dihidrotestosterona (DHT).
- **Componente dinámico** Debido al aumento y disfunción en el tono muscular que de forma reactiva se produce en el músculo liso prostático y vesical mediado por receptores α -adrenérgicos.

Los LUTS se refieren a un grupo de síntomas urinarios, cuya prevalencia es dependiente de edad (Roehrborn y col., 2002).

Las manifestaciones clínicas pueden dividirse en:

- **Obstructivas o de vaciado:** vaciado incompleto, micción intermitente, disuria
- **Irritativas o de llenado,** debidas generalmente a la inestabilidad del detrusor y la disfunción vesical: urgencia miccional, polaquiuria, nocturia

Disfunción eréctil asociada a LUTS/HBP

La resección transuretral de la próstata es el procedimiento quirúrgico que con más frecuencia se realiza para tratar los síntomas de obstrucción de la vía urinaria inferior y se menciona a menudo entre los muchos factores de riesgo relacionados con la producción de disfunción eréctil, aunque los datos existentes en la literatura no son muy concluyentes. La causa de la disfunción eréctil asociada con la resección transuretral de la próstata no está del todo definida. Se ha relacionado con lesiones

intraoperatorias de las estructuras nerviosas implicadas en la erección, con la aparición posoperatoria de fístulas cavernoso-espongiosas que condicionan alteraciones del mecanismo veno-oclusivo y con factores psicológicos (Padma-Nathan, 1988). La cirugía pélvica puede ser responsable de ciertos casos de disfunción eréctil neurogénica. Los nervios parasimpáticos son fundamentales en la erección y pueden resultar dañados por procedimientos tales como la extirpación de la próstata (Martínez-Jabaloyas y col., 2010).

La evidencia clínica muestra una asociación significativa entre la DE y los LUTS (Feldman y col., 1994; Macfarlane y col., 1996; Frankel y col., 1998; Braun y col., 2003), y se han publicado estudios epidemiológicos que señalan la existencia de un amplio número de pacientes que manifiestan simultáneamente tanto DE como LUTS (Feldman y col., 1994; Rosen y col., 2005). Esta asociación plantea que puedan existir mecanismos fisiopatológicos comunes. Se han propuesto factores tanto orgánicos como psicogénicos como responsables de la DE en pacientes con LUTS (Frankel y col., 1888; Macfarlane y col., 1996; Goldstein, 2000; Rosen y col., 2005). Una serie de mecanismos fisiopatológicos podrían contribuir tanto a la DE como a los LUTS, incluyendo el deterioro de la vía de señalización del NO/GMP_C (Rosen, 2006), la desregulación de los receptores α -adrenérgicos, el incremento de la actividad RhoA-Rho quinasa (ROCK) (McVary, 2005), la disfunción endotelial y los cambios ateroscleróticos (Mouli y col., 2009) (fig. 15). Como se ha mencionado anteriormente, el deterioro de la vía del NO/GMP_C está claramente establecido en el tejido eréctil de los pacientes con DE (Gratzke y col., 2010; Angulo y col., 2010a). También, existen evidencias del papel del NO en la regulación del tono del músculo liso de la vejiga, próstata y uretra (Kedia y col., 2008), al igual que se detecta la expresión y la actividad de los enzimas responsables de la síntesis de NO, eNOS y nNOS (Dixon y col., 1995; Kedia y col., 2008), liberando NO en respuesta a varios estímulos (Gillespie y col., 2006), y de la enzima que regula esta vía hidrolizando el GMP_C, la PDE5 (Fibbi y col., 2010). Esto puede explicar la modulación de las respuestas funcionales de la vejiga y próstata humanas por inhibidores PDE5 (Angulo y col., 2012), que también han mostrado eficacia clínica en el tratamiento de los LUTS (McVary y col., 2007). La observación del deterioro de los nervios y el endotelio con déficit en la producción de NO en la hipertensión o en el síndrome metabólico hace pensar en la asociación de DE y LUTS ya que estos factores de riesgo cardiovascular son frecuentemente observados en pacientes estas patologías (Corona y col., 2007).

Otro mecanismo que puede contribuir tanto a la DE como a los LUTS es la hiperactivación de la Rho-quinasa. Existen evidencias de hiperactivación de esta vía en modelos de DE (Guagnini y col., 2012; Hannan y col., 2013). Se ha demostrado alteración en la vía de señalización RhoA-ROCK en el cuerpo cavernoso (Fibbi y col., 2008), así como en vejiga de ratas SHR que desarrollan HBP y VH (Wibberley y col., 2003). La inhibición de la enzima ROCK limita la VH, reduce las contracciones de las muestras de

vejiga de ratas SHR (Rajasekaran y col., 2005; Inoue y col., 2012) y mejora la función eréctil (Fibbi y col., 2008).

Se ha sugerido que un incremento de la actividad simpática del sistema adrenérgico desempeña un importante papel en la fisiopatología de la DE y de los LUTS asociados a HBP (Yassin y col., 2006). La hiperactividad autonómica está relacionada con una desregulación del tono parasimpático y simpático. Estudios en un modelo de rata hiperlipidémica apoyan la correlación entre la hiperactividad autonómica y los LUTS/DE ya que se observó un agrandamiento de la próstata, VH y DE (Rhaman y col., 2007). Al igual que en ratas hipertensas se observó el desarrollarlo de un incremento de la actividad autonómica, hiperplasia prostática, LUTS y DE (Golomb y col., 2000). De hecho, los antagonistas α_1 -adrenérgicos se utilizan en la clínica para tratar los síntomas urinarios en pacientes con HBP (Roehrborn y col., 2004). Esta hiperactivación adrenérgica podría estar relacionada con el deterioro de la vía del NO/GMP_C ya que la estrategia de inhibir la PDE5, potenciando esta vía, en combinación con el bloqueo α_1 -adrenérgico resulta en una eficacia superior a la obtenida con ambos tratamientos por separado para reducir las contracciones neurogénicas del cuello de la vejiga y la próstata humana (Angulo y col., 2012).



Fig. 15. Representación esquemática de los mecanismos patogénicos comunes vinculados a LUTS como resultado de HBP y DE. NO: óxido nítrico; GMP_C: guanosin monofosfato; ROCK: Rho-quinasa; HBP: hiperplasia benigna de próstata; LUTS: síntomas del tracto urinario inferior; DE: disfunción eréctil. (Esquema modificado de Gacci y col., 2011).

Introducción

La aterosclerosis de próstata, pene y vejiga representa un mecanismo que conecta todas las teorías anteriores porque la aterosclerosis pélvica, reduce la señalización del NO, altera la vía del Rho/ROCK, y promueve la hiperactividad autonómica (Montorsi y col., 2006). Estudios preclínicos han demostrado que la hipoxia o la isquemia de la vejiga se correlaciona estrechamente con alteraciones en el tejido eréctil y en los LUTS (Ghafar y col., 2002) a través de inducir fibrosis y reducción de la NOS (Du y col., 2003). Además, modelos animales de hiperlipidemia y síndrome metabólico desarrollan HBP, VH y DE (Rahman y col., 2007; Vikram y col., 2010) (fig.15).

- Objetivos -

Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la estimulación farmacológica de los K_{Ca} como estrategia terapéutica para mejorar la eficacia del tratamiento convencional de la DE en diabetes y para aliviar la hiperactividad vesical, que frecuentemente se asocia a la DE.

Los objetivos concretos fueron los siguientes:

- Determinar el papel de los K_{Ca} en las relajaciones causadas por la inhibición de la PDE5 en CCH y ARPH.
- Analizar la expresión y localización de los K_{Ca} en el CC y ARP de humanos y ratas.
- Caracterizar el impacto de la diabetes sobre las respuestas funcionales mediadas por NO/GMP_C en el CCH y las ARPH y evaluar la influencia de la activación de los K_{Ca} sobre la eficacia vasodilatadora de un inhibidor de la PDE5 en las ARPH de pacientes diabéticos.
- Evaluar la eficacia *in vivo* de los activadores de los K_{Ca} para potenciar los efectos pro-eréctiles de los inhibidores de la PDE5, tanto en condiciones fisiológicas como en un modelo animal de DE diabética.
- Analizar los efectos de la activación de los BK en la contracción neurogénica y miogénica de la vejiga humana de sujetos sanos y pacientes que presentan alteraciones urinarias relacionadas con la hiperplasia benigna de próstata (HBP).
- Evaluar la eficacia de la activación de los BK para reducir la actividad vesical en un modelo de vejiga hiperactiva en rata.

- Materiales y Métodos -

Métodos

Tejido de pene humano

Los especímenes de cuerpo cavernoso humano se obtuvieron de donantes de órganos fallecidos como consecuencia de un accidente de tráfico, un traumatismo craneoencefálico o un accidente cerebrovascular, así como de pacientes con disfunción eréctil en el momento de la cirugía para la implantación de una prótesis peneana. La obtención de los especímenes fue aprobada por los Comités Éticos de las respectivas instituciones, que incluían diferentes hospitales públicos y privados de España y Portugal. Los tejidos se mantuvieron a 4-6 °C en solución M-400 (composición por 100 ml: 4,19 g de manitol, 0,205 g de KH_2PO_4 , 0,97 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,112 g de KCl, 0,084 g de NaHCO_3 , pH 7,4) en el momento de la obtención de la biopsia y fueron transportados al laboratorio para su utilización dentro de las 24 horas siguientes (Simonsen y col., 1997, Angulo y col., 2002; Angulo y col., 2003b; Angulo y col., 2009; Angulo y col., 2010a) (fig. 16).



Fig. 16. Muestra de tejido de pene humano obtenida de un donante de órganos.

Se emplearon muestras procedentes de un total de 235 pacientes de Hospitales de España y Portugal. De los especímenes, 61 eran procedentes de donantes de órganos sin antecedentes conocidos de DE y 174 procedentes de pacientes con disfunción eréctil. Las características epidemiológicas de estos pacientes se muestran en la tabla 2.

	Donante de Órganos	Pacientes No Diabéticos	Pacientes Diabéticos
n	61	88	86
Edad (años)	38,7±2,3	56,4±1,0	55,9±1,2
Tratamiento de la Diabetes			
Hipoglucemiantes			23 (29,0%)
Insulina			56 (58,1%)
Sin tratamiento			7 (12,9%)
Hipercolesterolemia	1 (1,6%)	21 (23,9%)	24 (27,9%)
Hipertensión	4 (6,5%)	24 (27,3%)	30 (35,7%)
Alteraciones Neurológicas	1 (1,6%)	27 (30,7%)	14 (16,7%)
Alteraciones Hormonales	0	1 (1,1%)	0

Tabla 2. Características epidemiológicas de los pacientes cuyos tejidos fueron recogidos para este estudio.

Reactividad vascular de arterias de resistencia del pene humano

De las muestras de cuerpo cavernoso se obtuvieron las arterias helicinas (con un diámetro luminal de 150-400 μm), que son las ramas terminales de las arterias profundas del pene. Se disecaron eliminando cuidadosamente el tejido trabecular circundante y se seccionaron en segmentos arteriales de 2 mm de longitud. (fig. 17A). Los segmentos vasculares se dispusieron sobre dos alambres de 40 μm de diámetro en un miógrafo de Halpern-Mulvany (J.P. Trading, Aarhus, Dinamarca) para el registro de la tensión isométrica. Uno de los alambres estaba fijo a un transductor de fuerza y el segundo a un tornillo micrométrico de desplazamiento y ambos se colocaron paralelos dentro de la luz del segmento vascular (fig. 17B) (Angulo y col., 2003a). Los segmentos arteriales se encontraban, a su vez, sumergidos en una solución Krebs-Henseleit (KHS) con la siguiente composición: 119 mM NaCl, 4,6 mM KCl, 1,5 mM CaCl_2 , 12 mM MgCl_2 , 24,9 mM NaHCO_3 , 11 mM glucosa, 1,2 mM KH_2PO_4 y 0,027 mM EDTA, a 37 °C, continuamente burbujeada con una mezcla de 95% O_2 / 5% CO_2 para oxigenar y mantener un pH de 7,4. Tras un periodo de estabilización de 30 min, se calculó la tensión pasiva y el diámetro interno del vaso (L100), a partir de sucesivas lecturas de distensión de los segmentos

vasculares, determinando la presión correspondiente a cada distensión. Se finaliza la distensión del vaso cuando la presión excede los 100 mmHg (13,3 Kpa). La circunferencia interna (L1) viene dada por la ecuación $L1 = 0,9 \times L100$ (equivalente al 90% de la presión transmural de 100 mmHg a la cual el desarrollo de la fuerza se acerca al máximo) (Mulvany y col., 1977).

Tras un periodo de equilibrio a la tensión adecuada, y para examinar la funcionalidad del músculo liso, las arterias se expusieron a una solución de 120 mM K⁺ (KKHS, sustitución equimolar de NaCl por KCl en KHS) y se midió la respuesta contráctil. Las arterias se contrajeron con norepinefrina (NE) 1-5 μ M (aproximadamente el 80% de la contracción inducida por la KKHS) hasta obtener un tono contráctil estable. La homogeneidad de la contracción fue especialmente importante en los experimentos de curvas paralelas (ej. dosis-respuesta a sildenafil, tadalafilo y a 8-Bromo-GMP_c), en las que se procuró obtener el mismo tono contráctil.

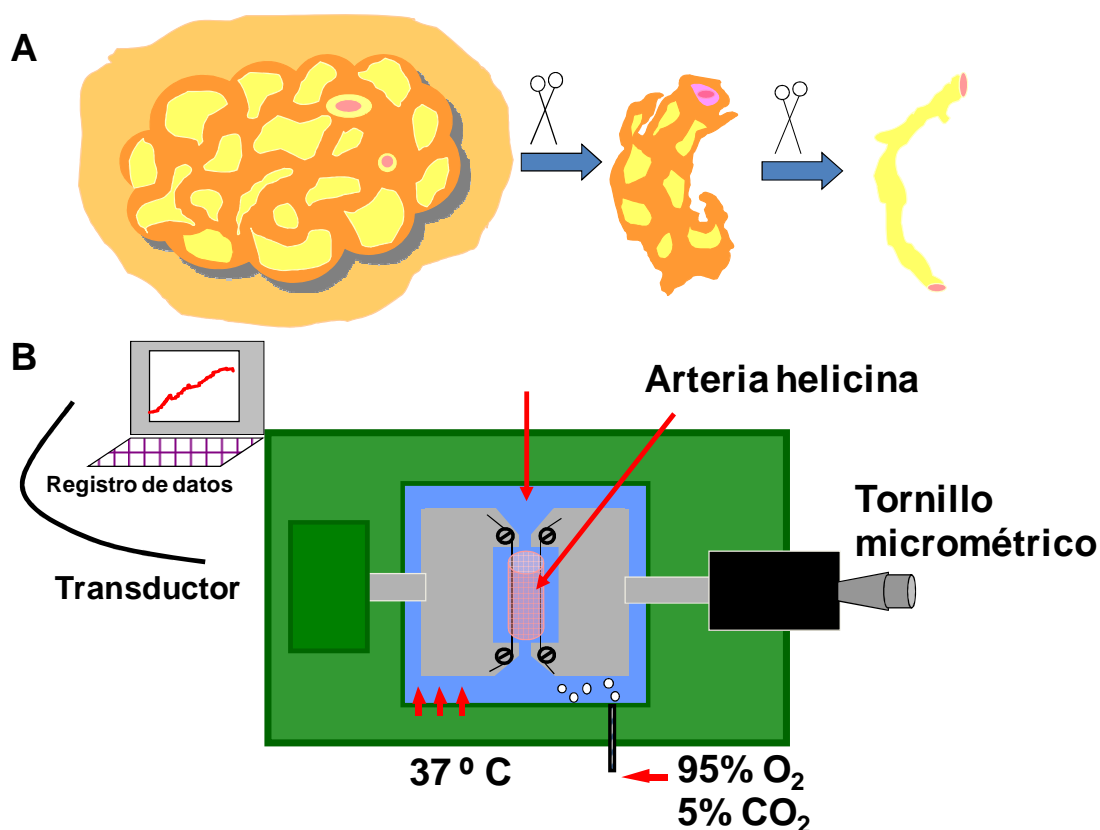


Fig. 17. (A) Muestra de una arteria helicina aislada del tejido peneano humano y disecada del tejido trabecular circundante. (B) Representación de un segmento vascular de pene humano montado en un miógrafo de Halpern-Mulvany.

Para obtener segmentos arteriales desprovistos de endotelio se pasó repetidamente un cabello humano a través de la luz vascular. Se determinó la eliminación del endotelio a nivel funcional comprobando la ausencia de respuesta relajadora tras la exposición a ACh (10 μ M).

La aplicación de la estimulación eléctrica transmural en las arterias (EET) se llevó a cabo utilizando microelectrodos de platino (JP Trading) adaptados al miógrafo y conectados a un estimulador eléctrico y a un amplificador de la corriente (Cibertec, Madrid, España). Los parámetros de la EET fueron: 75 mA, 0,3 ms durante 20 s a frecuencias crecientes: 0,5, 1, 2, 4, 8 y 16 Hz con intervalos de 5 min entre cada estimulación. Las respuestas a la EET se evaluaron en segmentos vasculares contraídos con NE y tratados previamente (45 min antes) con atropina (0,1 μ M) que bloquea los receptores muscarínicos, y guanetidina (10 μ M) que inhibe la neurotransmisión adrenérgica. De este modo se obtuvieron respuestas relajantes neurogénicas, no adrenérgicas no colinérgicas, en las arterias.

Se evaluaron las respuestas relajadoras tras la adición sobre las cámaras de cantidades acumulativas de los distintos compuestos. Se consideraron los controles de los efectos de los diferentes tratamientos las curvas de respuesta-concentración de los segmentos arteriales del mismo paciente que recibieron sólo el vehículo (0,001% DMSO). La respuesta relajadora se expresó como el porcentaje de la relajación total (pérdida de tono) inducida por la adición de papaverina (0,1 mM) a las cámaras al final del experimento.

Experimentos con cuerpo cavernoso humano

A partir de los especímenes de tejido peneano humano, también se obtuvieron tiras de cuerpo cavernoso humano (3x3x7 mm de tamaño aproximado) y se sumergieron en las cámaras de órganos con 8 ml de KHS, mantenidos a 37 °C y burbujeados con 95% O₂ / 5% CO₂, a pH 7,4 (fig. 18). Tras un periodo de estabilización de 60 min, cada tira de tejido se sometió a una sucesión de estiramientos para determinar su tensión óptima, que se estableció cuando la respuesta contráctil a 1 μ M de fenilefrina (PE) fue máxima (Kim y col., 1991, Angulo y col., 2003b). Del mismo modo que en las arterias, para examinar la funcionalidad del músculo liso de las tiras del cuerpo cavernoso, éstas se expusieron a una solución de 125 mM K⁺ y se midió la respuesta contráctil. Las respuestas relajadoras se evaluaron mediante la adición a las cámaras de concentraciones acumulativas de los distintos compuestos, sobre las tiras de cuerpo cavernoso, contraídas con PE 0,5-3 μ M (aproximadamente el 80% de la contracción inducida por la KKHS).

Se trata de obtener una contracción comparable en cada tira de tejido, una cuestión especialmente importante en los experimentos en paralelo donde se intenta conseguir que tengan un tono contráctil comparable. Las respuestas relajadoras se expresaron como el porcentaje de la relajación total (pérdida de tono) inducida por la adición de papaverina (0,1 mM) a cada una de las cámaras al final del experimento.

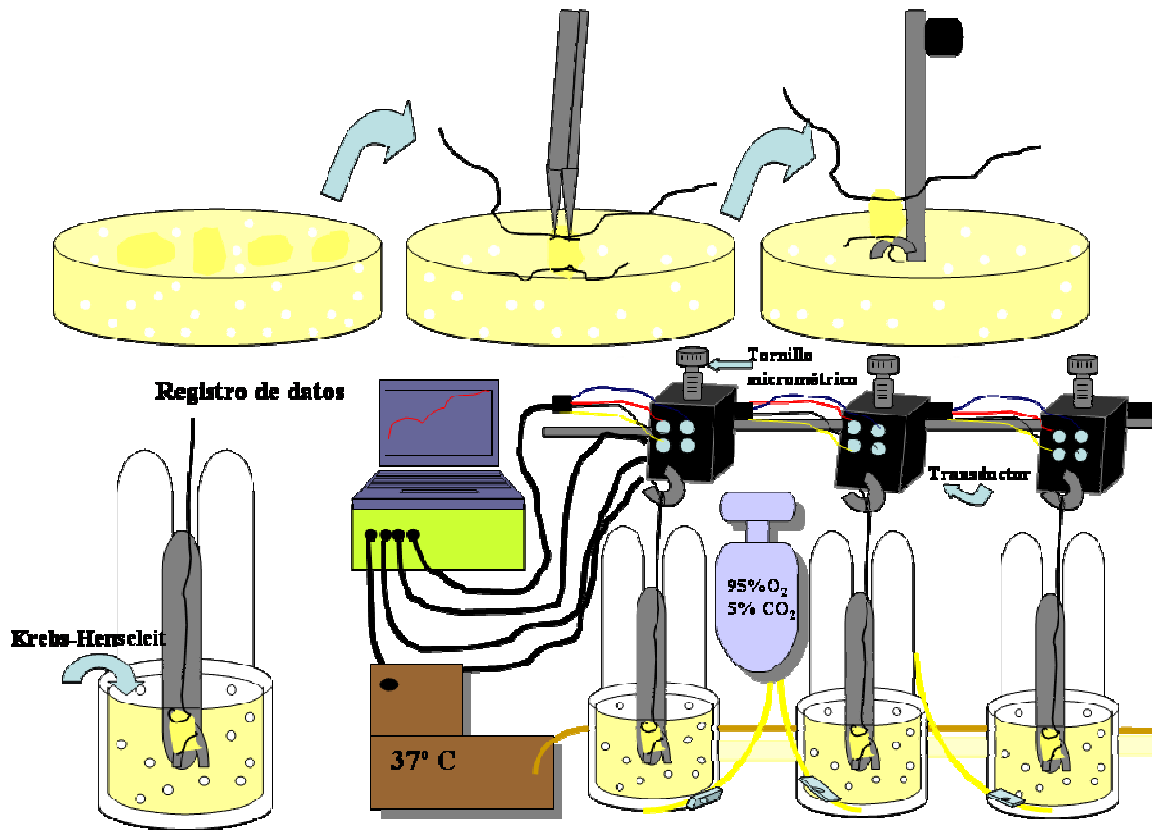


Fig. 18. Muestra de tiras de cuerpo cavernoso de pene humano montadas en un baño de órganos.

La EET se aplicó en las tiras de cuerpo cavernoso a través de dos electrodos de platino colocados a ambos lados del tejido y conectados a un estimulador eléctrico y a un amplificador de la corriente (Cibertec). Los parámetros de estimulación fueron: 75 mA, 0,5 ms durante 20 s a las frecuencias de 0,5, 1, 2, 4, 8 y 16 Hz. Para evaluar las respuestas relajadoras neurogénicas no adrenérgicas no colinérgicas (NANC) la EET se aplicó en tiras de cuerpo cavernoso precontraídas con PE. Estos tejidos se trataron previamente (60 min antes) con atropina (0,1 μ M) y guanetidina (10 μ M) para prevenir la activación de la neurotransmisión colinérgica y adrenérgica, respectivamente.

Animales de experimentación

Los animales empleados en este estudio, ratas de la cepa Sprague-Dawley, procedieron del Animalario del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid).

Modelo de diabetes

Los estudios se realizaron de acuerdo con la declaración de Helsinki y con la legislación vigente sobre el Uso de Animales de Experimentación, y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Ramón y Cajal (Exp.11/2010). Se emplearon 60 ratas macho sometidas a ciclos de 12h luz/oscuridad con libre acceso a la comida y al agua. La diabetes dependiente de insulina se indujo en ratas macho de 12 semanas de edad de la cepa Sprague-Dawley por una administración única de estreptozotocina (60 mg/Kg; intraperitoneal) disuelta en un tampón de ácido cítrico-citrato trisódico (0,1 M), a un pH 4-4,5. Después de una semana se obtuvieron muestras de sangre de la cola y se midieron los niveles de glucosa utilizando un glucómetro Accutrend (Boehringer Mannheim, Alemania). Se consideraron diabéticas las ratas cuyos niveles de glucosa en sangre superaron los 200 mg/dl (>11 mM) en ese momento. Los niveles de glucemia fueron evaluados semanalmente. Los animales controles no diabéticos se inyectaron con la solución tampón (buffer de citrato) y se mantuvieron en las mismas condiciones que las ratas diabéticas. Los experimentos se llevaron a cabo tras un periodo de 8 semanas después de la inducción de la diabetes. Este periodo de evolución de la diabetes es suficiente para observar, *in vivo* e *in vitro*, alteraciones en la función vascular y eréctil (Rehman y col., 1997; Angulo y col., 1998; Escrig y col., 2002; Angulo y col., 2005; Angulo y col., 2010b). Tras la evaluación de las respuestas eréctiles las ratas se sacrificaron con una sobredosis de anestesia.

Determinación de las respuestas eréctiles a la estimulación eléctrica del nervio cavernoso en ratas anestesiadas

Las ratas se anestesiaron con ketamina (60 mg/Kg) (Pfizer Parke-Davis, S.L. Alcobendas, Madrid, España) y diazepam (4 mg/Kg) (Roche Farma, S.A.). El procedimiento quirúrgico consistió en la realización de una incisión transversal en la zona escrotal accediendo a la base de los cuerpos cavernosos del pene separando ligeramente el músculo isquio-cavernoso. La presión intracavernosa (PIC) se registró a través de una aguja de calibre 25 G insertada en la base del cuerpo cavernoso (fig. 19A) que estuvo conectada a un transductor de presión (Abbott, Sligo, Irlanda) y se registró en el sistema de adquisición de datos MacLab (ADInstruments, Castle Hill, Australia). Mediante una incisión en la zona medial inferior del abdomen se expuso la próstata del animal y se aisló el nervio cavernoso en la zona postero-lateral derecha de la misma.

Se cateterizó la vena yugular externa derecha para la infusión de solución salina (0,9% NaCl) o los fármacos y la arteria carótida izquierda para la medición continua de la presión arterial sistémica a través de un transductor de presión conectado al sistema de datos MacLab. De la señal obtenida del

registro de la presión arterial se obtuvo el registro de la frecuencia cardíaca mediante el software del sistema de adquisición de datos. El animal recibió una infusión continua de solución salina a lo largo de todo el experimento (5 ml/h). El nervio cavernoso se estimuló con un electrodo bipolar de platino en forma de gancho (fig. 19B), conectado a un estimulador y a un amplificador de la corriente (Cibertec CS-9, Madrid, España). La estimulación eléctrica del nervio cavernoso (EENC) consistió en la aplicación de pulsos de 1,5 mA de intensidad, 1 ms de duración, durante un minuto, a frecuencias de 1, 3 y 10 Hz con un intervalo de 3 min entre ellas (Angulo y col., 2005; Angulo y col., 2009; Angulo y col., 2010b) (fig. 19C).

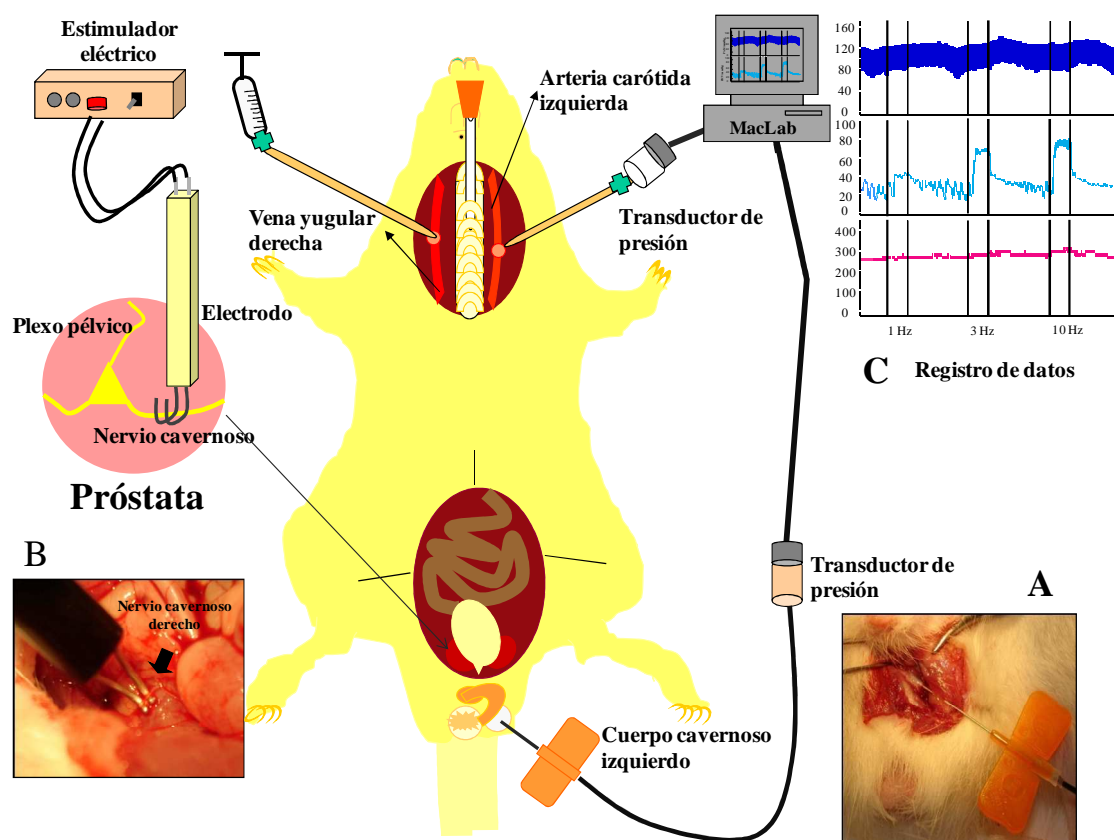


Fig. 19. Registro de la presión intracavernosa en un modelo de evaluación de las respuestas eréctiles en rata. (A) Inserción de una aguja de calibre 25 G en la base del cuerpo cavernoso izquierdo. (B) Estimulación eléctrica del nervio cavernoso (EENC) derecho con un electrodo bipolar. (C) Registro de la presión arterial, de la PIC y de la frecuencia cardíaca durante la EENC.

Para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos sobre las respuestas eréctiles a la EENC, se realizó una curva frecuencia-respuesta control y, tras un periodo de estabilización, se administró por vía intravenosa el NS1619 (0,3 mg/kg), el NS-8 (0,3 mg/kg) o el vehículo (5% DMSO+15% hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) y tras un periodo de 15 min de incubación se repitió la curva de estimulación. Las respuestas eréctiles se volvieron a determinar tras 15 min de incubación de una dosis más alta de

los activadores de los K_{Ca} (5 mg/kg). En otra serie de experimentos, para la evaluación de los efectos agudos de los diferentes tratamientos en las respuestas eréctiles, se llevó a cabo una curva de estimulación control y tras un periodo de estabilización, se administró intravenosamente el sildenafil (0,1 mg/kg ó 0,3 mg/kg) o el vehículo (15% HP β CD). Tras un periodo de incubación de 30 min, se administró por vía intravenosa el NS1619 (0,3 mg/kg) o el NS-8 (0,3 mg/kg) o el vehículo (5% DMSO+15% HP β CD). Se evaluaron de nuevo las respuestas eréctiles a la EENC 15 minutos después de la administración del NS1619, NS-8 o el vehículo. El volumen de inyección fue de 0,2 ml.

Histología

Fijación e inclusión en parafina

Los especímenes de cuerpo cavernoso, tanto de penes humanos como de ratas, se lavaron en tampón fosfato (PBS) para limpiar el tejido y mantener condiciones isotónicas e hidratación. Posteriormente se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, 0,1 M, pH 7,4, durante 4 ó 5 días a 4 °C para preservar el tejido en condiciones similares a las que tiene *in vivo*, evitar su deterioro y endurecerlo. Después se incluyeron en parafina para rodear las piezas de un material suficientemente rígido como para poder ser cortadas en secciones de poco espesor. Para ello, los especímenes se lavaron en PBS (dos veces durante 30 minutos cada lavado) y se deshidrataron sumergiéndolos en soluciones de menor a mayor concentración de alcohol (etanol al 70%, 80%, 96%, 100%; dos o tres lavados durante 20 ó 30 minutos cada uno) para posteriormente terminar en xilol, durante 60-90 min, dependiendo del grosor del tejido, hasta que quedaron transparentes. A continuación, los especímenes se incluyeron en distintos baños de parafina para la realización de los bloques. Después los bloques de parafina se cortaron en el microtomo (Leica Microsystems AG) en secciones de 5-7 μ m de grosor que se depositaron en portaobjetos silanizados (tratados con una sustancia, silano, que actúa como pegamento para depositar los cortes). Los cortes se mantuvieron en estufa a 37 °C durante 2 ó 3 días, hasta que se cambiaron a otra estufa a 60 °C durante 30 minutos, para favorecer la adhesión de los cortes.

Técnicas de tinción para observaciones con microscopio óptico

Tinción histológica con Hematoxilina-Eosina de Harris

Los cortes fueron desparafinados (10 min a 60 °C o toda la noche a 37 °C, 3 pasos de 5 a 10 minutos de xilol y por lo menos tres pasos de etanol, habitualmente 96°, 80° 70°, de 3 a 5 minutos) e hidratados llevándolos hasta agua destilada (5 min). A continuación, se colorearon con

hematoxilina de Harris (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 5-10 min. Tras lavar con agua, durante 10 min (agua corriente, en cubeta). La muestra se sumergió y se sacó rápidamente en una cubeta con alcohol clorhídrico (0.5% de HCl en etanol absoluto) varias veces, para eliminar el exceso de coloración en la muestra (diferenciación). Se neutralizó el ácido sumergiendo la muestra en agua corriente durante 2 min pasando por agua destilada antes de continuar. La muestra se sumergió en eosina durante 3-5 min y, tras la deshidratación se montaron en portaobjetos con el medio de montaje (Depex). La hematoxilina al ser básica tiñe ácidos, de color morado (núcleos con DNA y RNA) mientras que la eosina es un ácido y tiñe bases, de color rosado (citoplasma).

Tinción histológica con Tricrómico de Masson

Tras teñir con hematoxilina de Harris de igual modo a lo descrito anteriormente, se lavaron las muestras en una cubeta con agua corriente para eliminar el exceso del colorante. Después de un baño rápido con agua acética (1%), seguido de un baño rápido con agua corriente, se sumergieron en fucsina de Ponceau durante 5 min y se volvieron a lavar con agua corriente seguido de un baño rápido con agua acética 1%. Se sumergieron a continuación en ácido fosfomolibdico al 1% durante 5 min. Tras un baño rápido con agua acética 1% las muestras se sumergieron en azul de anilina durante 10 min. A partir de aquí los cortes se montaron del mismo modo a lo descrito en el apartado anterior.

Es una técnica para la coloración de fibras colágenas y elásticas. Se observan tres colores distintos: Núcleos de azul oscuro, citoplasma, queratina, fibras musculares, eritrocitos de rojo (rosado) colágeno y fibras de reticulina (colágeno III) de azul claro.

Técnica inmunohistoquímica

Para la realización del ensayo de inmunohistoquímica los especímenes de cuerpo cavernoso humano y de rata fueron fijados en 4% de paraformaldehído e incluidos en bloques de parafina. Los cortes fueron desparafinados con xilol como ya se ha descrito. Las muestras se sumergieron en 2 litros de citrato sódico a pH 6 en una olla a presión y se llevaron a ebullición durante 3 min para que tuviese lugar el desenmascaramiento antigénico. Tras 30 min de atemperación, se neutralizaron las peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei Manchen, Alemania) al 0,5% en metanol, durante 10 min en oscuridad. Las secciones se lavaron dos veces en tampón PBS y se incubaron con el tampón de bloqueo (0,1M PBS con suero de cabra al 5%, conteniendo Tritón X-100 (Sigma) al 0,1%) para un bloqueo inespecífico durante 60 min. Se retiró el bloqueo y las secciones se incubaron durante toda la noche a 4 °C, en cámara húmeda, con los

anticuerpos policlonales primarios de conejo contra la subunidad α de los K_{Ca} de humanos y ratas: anti-BK (péptido (C)STANRPNRK-SRESRDK, que corresponde a los aminoácidos 1184-1200, parte intracelular del dominio C-terminal), anti-IK (M20, péptido del dominio N-terminal GGDVLGLGALRRRK ratas y humano), anti-SK1 (L-155, péptido C-terminal CSSPYRWTPVAPSDYG para el canal de potasio humano SK1 y rb200, péptido CSPQSHWLPTTASDYG para el canal de ratas SK1) anti-SK2 humano (M1-péptido N-terminal CRRSSSTAPPTSSESS), anti-SK3 (M75, péptido C-terminal DTSGHFHDSGVGDLD ratas y humano). Los anticuerpos Anti-BK y anti-IK se utilizaron a una dilución de 1:50, mientras que los anticuerpos anti-SK se utilizaron a 1:20. El anticuerpo anti-BK se obtuvo de Alomone Labs (Jerusalén, Israel) y reacciona tanto con BK humano como con BK de ratas. Los otros anticuerpos fueron proporcionados por el Dr. Mark Chen de Glaxo- Smith-Kline (UK) quien describió previamente que detectan los diferentes canales K_{Ca} humano y de ratas (Chen y col., 2004). Después, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo Ig G (Zymed, San Francisco, CA, USA) durante una hora a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS, se mantuvieron los cortes en presencia del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) durante una hora. A continuación, se lavaron los cortes dos veces con PBS y se revelaron con 3, 3'-diaminobencidina (DAB Substrate Chromogen System, Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 7-10 min. Tras un lavado con agua destilada, se colorearon con hematoxilina (DakoCytomation) durante 30-60 s para conseguir contraste con el fondo y se deshidrataron y montaron como se ha descrito. Se llevaron a cabo los controles de los diferentes canales K_{Ca} , tanto en tejido humano como en tejido de ratas, siguiendo el mismo protocolo pero en ausencia del anticuerpo primario.

Determinación del contenido de GMP_c en cuerpo cavernoso humano

Las tiras de cuerpo cavernoso se sumergieron en las cámaras de órganos conteniendo 8 ml de KHS, mantenidas a 37 °C y aireadas con 5% CO_2 / 95% O_2 , a pH 7,4. Cada tira de tejido se sometió a una serie de estiramientos hasta obtener la tensión óptima, determinada por una respuesta contráctil máxima a 1 μM de PE. Los tejidos pasaron un tiempo de estabilización de 30 min y tras este período de tiempo cada muestra de tejido de cuerpo cavernoso se incubó con 0,5 μM de PE durante 15 min; después, los tejidos se trataron o no (controles) con 10 μM de ACh durante 5 min e inmediatamente después se congelaron con N_2 líquido, ya que los nucleótidos cíclicos son metabolizados rápidamente en el tejido. Una vez congelados, se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento. Para las determinaciones, los tejidos congelados se trituraron en un mortero sobre hielo seco para prevenir su

descongelación. Las muestras trituradas se llevaron a tubos de ensayo con 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) (Merck) al 6%, sobre hielo. Se homogeneizaron las muestras con un homogeneizador tipo Polytron (30 pases) sobre hielo. Los homogeneizados se centrifugaron a 5000 rpm (rotor JA20), a 4 °C durante 20 min. Se separaron los precipitados de los sobrenadantes con una pipeta Pasteur. Se dispusieron cuidadosamente los sobrenadantes en tubos de 10 ml. Los pellets fueron utilizados para la cuantificación de proteínas, almacenándose a -20 °C hasta su determinación. Se extrajo el TCA con éter dietílico (Panreac) saturado de agua (500 ml éter más 50 ml agua destilada), añadiendo 4 veces el volumen de la muestra. Se agitó con vórtex y se separó la capa superior, que corresponde al éter con el TCA (Kim y col., 1993). Este proceso se realizó 4 veces y en el último pase se desechó la fase del éter y la fase acuosa se decantó en viales de vidrio sobre hielo seco para su posterior liofilización. Las muestras congeladas se liofilizaron durante toda la noche y se almacenaron a -20 °C hasta la determinación por ELISA utilizando un kit de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Sáenz de Tejada y col., 2001; Angulo y col., 2009).

Con los valores de la concentración de GMP_C obtenidos en el ensayo se calculó el contenido total de GMP_C para cada muestra y se refirieron a los mg de proteína total presentes en el tejido de cuerpo cavernoso de procedencia (expresando la cantidad de GMP_C como pmol/mg de proteína) (Sáenz de Tejada y col., 2001; Angulo y col., 2009).

Determinación de proteínas (Método de Lowry)

El contenido de proteínas se determinó en los sedimentos obtenidos tras la homogeneización de los tejidos. A cada muestra se le añadió 1 ml de hidróxido sódico (NaOH 1 N) (Merck). Los tubos conteniendo las muestras se introdujeron en un baño de agua durante 60 min a una temperatura de 80 °C, y fueron agitadas cada 15 min hasta que se disolvió completamente la muestra. Para determinar la concentración de proteínas se realizó una curva patrón con una solución de albúmina sérica bovina (BSA).

Cada muestra se diluyó 10 veces con H₂O destilada. Se realizaron dos diluciones adicionales de cada muestra y se llevaron a 200 µl finales con el medio de dilución (NaOH 0.25 N).

Se preparó una mezcla con los reactivos A (Na₂CO₃ 2% y NaOH 0,1 N), reactivo B (CuSO₄·5 H₂O 1%) y reactivo C (Tartrato NaK 2%) (proporción 100:1:1) y se añadió 1 ml de esta mezcla a cada tubo con las muestras. Se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después, se añadieron 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu (Folin-C, diluido en H₂O destilada en proporción 1:1) a cada tubo. El reactivo de Folin-C es de color amarillo, pero cuando reacciona con las proteínas cambia a color azul.

Los tubos se incubaron durante 30 min en la oscuridad, se determinó la absorbancia a 680 nm y se calcularon los mg de proteína total (la cantidad de proteína se expresa en mg/ml) (Lowry y col., 1951).

Especímenes de vejiga humana

Los tejidos de vejiga humana se obtuvieron de 35 DO sin antecedentes de problemas urinarios (incluyendo a 6 mujeres) y de 20 pacientes a los que se les practicó una adenomectomía suprapúbica por hiperplasia benigna de próstata (HBP) después de dar el consentimiento informado. Estos tejidos provinieron de las mismas instituciones y colaboradores clínicos que los tejidos cavernosos y su obtención fue refrendada por los Comités Éticos respectivos. La edad media de los pacientes fue de $55,7 \pm 2,4$ años (rango 20-77). Ocho pacientes presentaban hipertensión (14,5%) y cuatro pacientes padecían de diabetes tipo 2 (7,3%). Para evaluar y comparar las respuestas del tejido de la vejiga de donantes de órganos (saludables) y de pacientes con HBP, y se evaluaron tejidos de dos subgrupos de 14 pacientes de cada grupo. La edad media del grupo de los donantes de órganos fue de $50,9 \pm 4,3$ años (no se incluyeron muestras procedentes de mujeres) y de $68,1 \pm 1,2$ años para pacientes con HBP ($p < 0.001$). Los pacientes con HBP presentaban síntomas urinarios y fueron tratados con antagonistas de los receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos (9/14) y/o con inhibidores de 5- α -reductasa (7/14) antes de la cirugía.

Estudios de contractilidad

Las muestras de vejiga humana se limpiaron de grasa y de tejido conectivo y se obtuvieron tiras teniendo cuidado de no dañar la capa del urotelio. Las tiras de vejiga se sumergieron en las cámaras de órganos con 8 ml de KHS, mantenidos a 37 °C y burbujeados con 95% O₂ / 5% CO₂, a pH 7,4. Los tejidos se sometieron a una tensión basal o de reposo de 1,5 g durante 90 min y se determinó la contracción provocada por 120 mM K⁺. La EET se aplicó en las tiras de vejiga a través de dos electrodos de platino colocados a ambos lados del tejido y conectados a un estimulador eléctrico y a un amplificador de la corriente (Cibertec, CS-9, Madrid, España). Los parámetros de la EET consistieron en pulsos de 0,5 ms durante 20 s de 0.5-48 Hz con una intensidad de corriente de 75 mA. Se determinaron las repuestas contráctiles tras la aplicación de la EET en las tiras de vejiga humana. Tras un periodo de estabilización, las muestras se incubaron con el vehículo o con alguno de los tratamientos durante 30 min. Tras este periodo de tratamiento se volvieron a evaluar las respuestas contráctiles inducidas por la aplicación de la EET. Para la evaluación de las respuestas contráctiles en tejido de vejiga humana inducida por estimulación colinérgica, las tiras de vejiga humana, se

expusieron al vehículo o a alguno de los tratamientos. Después de 30 min, las tiras de vejiga humana se trataron con carbacol (1 nM a 30 μ M) y se determinaron las respuestas contráctiles.

Cistometrías

Se emplearon ratas hembras y machos Sprague-Dawley (300-350 g). Se anestesiaron con uretano (1,2 g/kg; i.p.) y se cateterizó la arteria carótida izquierda para registrar la presión arterial por medio de un transductor de presión conectado a un sistema de adquisición de datos MacLab (ADInstruments,). La frecuencia cardiaca se obtuvo de la señal de la presión arterial. La vejiga urinaria se cateterizó con un catéter de polietileno que se introdujo en la luz de la vejiga y se fijó a ella con una sutura. El catéter se conectó a un transductor de presión y al sistema de MacLab para registrar la presión intravesical. El catéter intravesical se conectó a una bomba de infusión (Harvard Apparatus, Harvard, MA, USA). Tras un periodo de estabilización, se infundió de manera continua, en la vejiga, solución salina (0,9% NaCl; 5 ml/h) durante 20 min. Se determinó la frecuencia de micción, el volumen de micción y la presión intravesical. Tras esta infusión, se administraron intravenosamente los diferentes fármacos y tras 20 min de tratamiento una nueva infusión de 0,9% NaCl permitió volver a evaluar los parámetros urodinámicos. Para estudios en el modelo de vejiga hiperactiva, se hizo una infusión control con 0,9% NaCl. Tras un periodo de estabilización, se indujo la hiperactividad vesical por una infusión intravesical de 0,9% NaCl conteniendo 0,3% ácido acético (Kakizaki y de Groat, 1996). Una vez que se confirmó que la vejiga era hiperactiva se administraron intravenosamente los diferentes fármacos y tras 20 min de tratamiento, la solución de salino conteniendo 0,3% de ácido acético se infundió nuevamente para evaluar los diferentes parámetros urodinámicos en las diferentes condiciones (fig. 20).

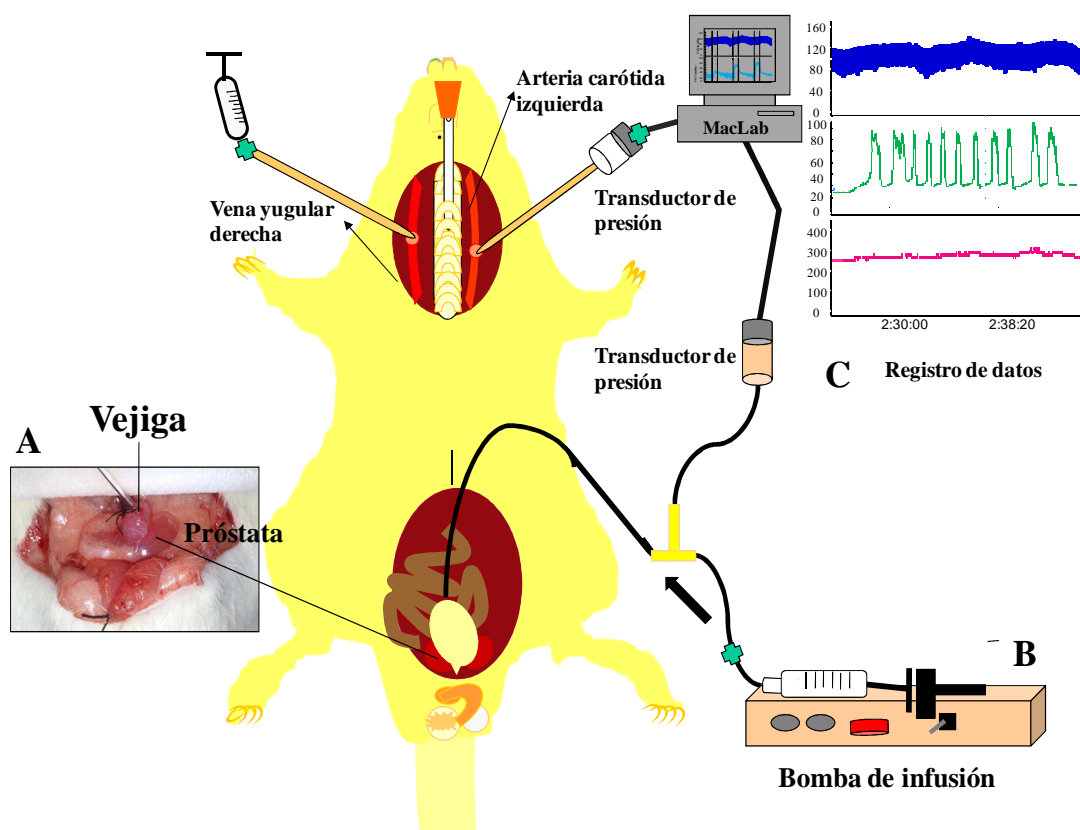


Fig. 20. Registro de la presión intravesical (PIV) en un modelo de evaluación de los parámetros urodinámicos en rata. (A) Inserción de un catéter de calibre 18 G en la vejiga (B) Conexión del catéter intravesical a la bomba de infusión (C) Registro de la presión arterial, de la PIV y de la frecuencia cardíaca durante la evaluación de los parámetros urodinámicos .

Reactivos y materiales

1,3-dihidro-1-[2-hidroxi-5-(trifluorometil)fenil]-5-(trifluorometil)-2H-benzimidazol-2ona (NS1619), 8-bromo GMP_c, ACh, apamina (APA), carbacol, caribdotoxina (ChTx), estreptozotocina, glibenclamida, guanetidina, HP β CD, fenilefrina, nitroprusiato sódico (NPS), norepinefrina (arterenol), N^G-nitro-L-arginina (L-NNA), oxibutinina, pinacidil y uretano se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

Atropina sulfato se obtuvo de B. Braun Medical SA (Rubí, España).

2-amino-5-(2-fluorofenil)-4-metil-1H-pirrol-3-carbonitrilo (NS-8) fue proporcionado por Laboratorios Dr. Esteve (Barcelona, España).

5[(2-clorofenil) (difenil)metil]-1H-pirazol (TRAM-34) y (3-oxima-6,7-dicloro-1H-pirrol-3-carbonitrilo (NS309) fueron proporcionados por GlaxoSmithKline (Stevenage, UK) y los anticuerpos anti-IK, anti-SK1, anti-SK2 y anti-SK3 fueron proporcionados por el Dr. Mark Chen de GlaxoSmithKline.

La apamina, iberotoxina (IbTx), tetrodotoxina y el anticuerpo anti-BK se obtuvieron de Alomone Labs (Jerusalén, Israel).

Sildenafil se obtuvo de Pfizer (Sandwich, R.U.) y de Nitromed (Bedford, MA, USA) mientras que el tadalafil fue suministrado por ICOS Corporation (Seattle, WA, USA).

1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) se obtuvo de Cayman Chemical Co. (Ann. Arbor, MI, USA).

En los experimentos *in vitro*, todos los fármacos se disolvieron en agua desionizada, excepto el sildenafil, el tadalafil, el NS-8, el NS1619 y el NS309, que se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) a 10 mM (Malysz y col., 2004; Angulo y col., 2012; Martínez-Salamanca y col., 2014), la concentración final de DMSO fue de 0,03% o incluso más bajo y las sucesivas diluciones fueron en agua desionizada. Para la administración intravenosa, el sildenafil se disolvió en HP β CD al 15% y, tanto el NS1619 como el NS-8, en etanol al 5% y HP β CD al 15%, la oxibutinina se disolvió en 0,9% NaCl. Todos los fármacos se disolvieron en un volumen adecuado para su administración intravenosa *in vivo* (200-250 μ l).

Análisis estadísticos

Todos los datos se expresan como la media \pm error estándar (EE). Las curvas de relajación se expresan como porcentaje de la relajación máxima (pérdida de tono) inducida por la adición de 0,1 mM de papaverina en las cámaras al final del experimento. La EC₅₀ se define como la concentración requerida para obtener el 50% de relajación máxima mientras que la pD₂ se definió como $-\log M$ de la concentración requerida para obtener el 50% de la relajación máxima. Se calcularon gráficamente para cada curva individual. Las curvas de contracción se expresan como el porcentaje de la contracción causada por 120mM K⁺ (miogénicas) o como el porcentaje de la respuesta máxima a la EET en condiciones control (neurogénicas). Las curvas completas de concentración-respuesta o frecuencia-respuesta se compararon por un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores utilizando el programa Statview para ordenadores Apple (SAS, Cary, NC). La EF₅₀ se define como la frecuencia de la EET requerida para obtener el 50% de la contracción máxima. Se calcularon los ratios EF₅₀ de los tratamientos/EF₅₀ de la curva control para comparar los efectos de los tratamientos en las contracciones neurogénicas de las muestras de vejiga de donantes de órganos y de pacientes con HBP. E_{max} es la respuesta contráctil máxima expresada como el porcentaje de la contracción causada por 120 mM K⁺.

Un valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,05$) se consideró significativo, una $p < 0,01$ se consideró muy significativo y un valor de $p < 0,001$ se consideró extremadamente significativo. Los datos de GMP_C se expresaron pmol de GMP_C por mg de proteína del tejido. Para el análisis estadístico de estos se empleó un ANOVA de un factor seguido de un post-test Student-Newman-Keuls (GraphPad InStat, San Diego, CA). Las respuestas eréctiles se expresaron como el área bajo la curva (AUC) de los incrementos de la presión intracavernosa (PIC) (Total ΔPIC), tras la estimulación eléctrica del nervio cavernoso de la rata, normalizado por los valores de la presión arterial media tomada en el momento de cada estimulación. Las curvas completas de frecuencia-respuesta también se compararon mediante un ANOVA de dos factores. En la condición de hiperactividad vesical los parámetros urodinámicos se compararon por un ANOVA de un factor seguido de un test Student-Newmann-Keuls. El test de t-Student se utilizó también en el resto de comparaciones.

- Resultados -

Efectos de la modulación de los K_{Ca} sobre la relajación causada por la inhibición de la PDE5 en ARPH y en CCH

La activación de los canales K_{Ca} causa relajación en ARPH y CCH

La adición acumulativa de los activadores de los K_{Ca} , NS-8 y NS1619 (1 nM a 10 μ M), resultó en una vasodilación moderada de las arterias de resistencia de pene humano (ARPH) contraídas con norepinefrina (NE). La capacidad vasodilatadora de los activadores de los K_{Ca} se vio reducida cuando se retiró mecánicamente el endotelio en las muestras de ARPH (fig. 21A y 21B). En las tiras de CCH contraídas con fenilefrina (PE) se produjo una relajación moderada a las concentraciones crecientes de NS-8 y NS1619 (1 nM a 30 μ M; fig. 21C y 21D). Esta relajación fue similar en magnitud a la observada en las ARPH.

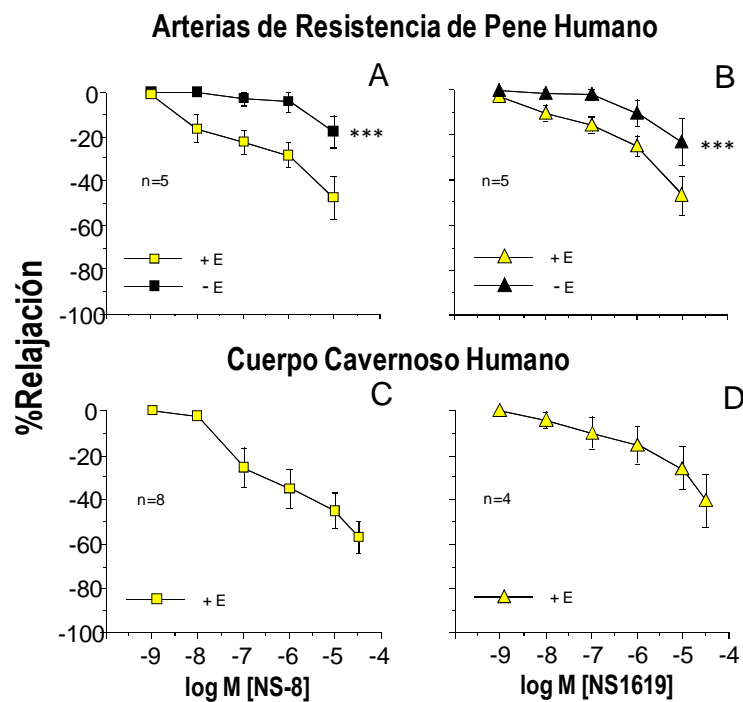


Fig. 21. Vasodilatación de las ARPH contraídas con NE (A y B) y relajación del CCH contraído con PE (C y D) por la adición de los activadores de K_{Ca} , NS-8 (A y C) y NS1619 (B y D). Los efectos de la desendotelización (-E) sobre la vasodilatación inducida por NS-8 y NS1619 en las ARPH se muestra en los paneles A y B respectivamente. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la relajación máxima inducida por papaverina (0,1 mM) al final del experimento. n indica el número de pacientes de los que se obtuvieron los tejidos para los experimentos. Todos los grupos de datos incluyeron dos pacientes diabéticos. *** indica $p < 0,001$ versus control por un test ANOVA de dos factores.

La modulación de los canales K_{Ca} influencia la capacidad relajadora de los inhibidores de la PDE5 en ARPH pero no en CCH

El inhibidor de la PDE5, sildenafil, causó relajación dependiente de la concentración de las ARPH contraídas con NE. Las vasodilataciones inducidas por el sildenafil fueron inhibidas por el tratamiento de los segmentos arteriales con el inhibidor de la NOS, N^G -nitro-L-arginina (L-NNA; 100 μ M) o por el tratamiento con un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, ODQ (20 μ M); (fig. 22A) y también por el bloqueo de los K_{Ca} con una combinación de CTX (100 nM) y APA (100 nM; fig. 22B). Por el contrario, la activación de los K_{Ca} con NS-8 (10 μ M) resultó en una potenciación de la vasodilatación causada por el inhibidor de la PDE5 (fig. 22C).

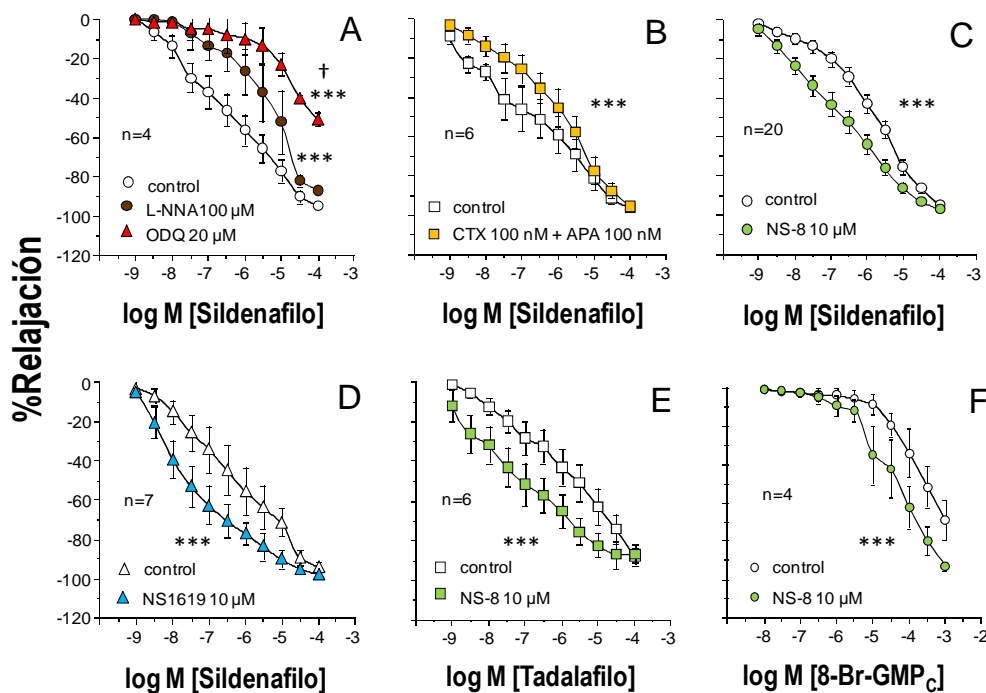


Fig. 22. Efectos de la inhibición de la NO sintasa con N^G -nitro-L-arginina (L-NNA; 100 μ M) o de la guanilato ciclasa soluble (GCs) con ODQ (20 μ M) (A), el bloqueo de los K_{Ca} con CTX (100 nM) y APA (100 nM) (B) y la activación de los K_{Ca} con NS-8 (10 μ M) (C) ó NS1619 (10 μ M) (D) sobre la relajación inducida por el inhibidor de la PDE5, sildenafil (1 nM a 100 μ M), en las ARPH contraídas con NE. Efecto de la activación de los K_{Ca} con NS-8 (10 μ M) sobre la relajación inducida por el inhibidor de la PDE5, tadalafil (1 nM a 100 μ M) (E), y sobre el análogo estable del GMP_C, 8-bromo-GMP_C (8-Br-GMP_C; 10 nM a 1 mM) (F) en ARPH contraídas con NE. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la relajación máxima inducida por papaverina (0,1 mM) al final del experimento. n indica el número de pacientes de los que se obtuvieron los tejidos para los experimentos. Los grupos de datos incluyeron 1 (A y E), 2 (B, C y F) ó 7 (C) pacientes diabéticos *** indica $p < 0,001$ versus control, † $p < 0,05$ versus L-NNA por un test ANOVA de dos factores.

Del mismo modo, se obtuvo una potenciación similar de las relajaciones inducidas por el sildenafil tras el tratamiento de las ARPH con otro activador de los K_{Ca} , NS1619 (10 μ M; fig. 22D). Estos efectos no

estuvieron relacionados con alteraciones en la capacidad contráctil de la NE ya que el tratamiento con NS-8 ó NS1619 no influyó significativamente en la contracción inducida por la NE en las ARPH ($11,4 \pm 1,7$ mN versus $11,8 \pm 1,4$ mN para el vehículo y NS-8, respectivamente, $n=28$; y $15,1 \pm 4,5$ mN versus $14 \pm 5,2$ mN para el vehículo y NS1619, respectivamente, $n=7$). Además, el efecto potenciador del NS-8 ($10 \mu\text{M}$) se mantuvo cuando el inhibidor de la PDE5 utilizado fue el tadalafilo en vez del sildenafil (fig. 22E). El análogo estable del GMP_c, 8-bromo-GMP_c (8-Br-GMP_c) también dilató las ARPH, y esta respuesta vasodilatadora se potenció por el tratamiento con NS-8 ($10 \mu\text{M}$; fig. 22F).

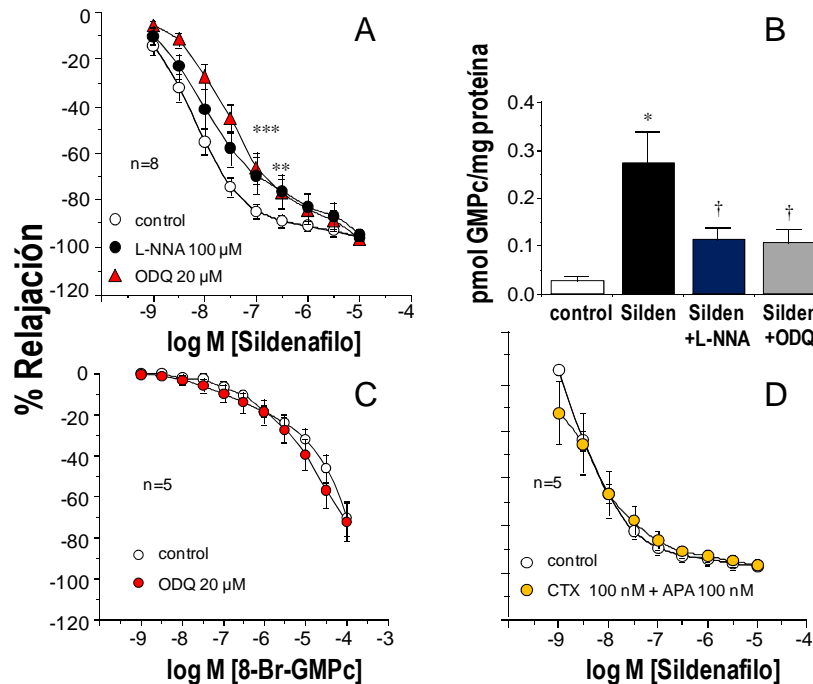


Fig. 23. Efectos de la inhibición de la NOS con N^G-nitro-L-arginina (L-NNA; 100 μM) o de la guanilato ciclasa soluble (GCs) con ODQ (20 μM) sobre la relajación inducida por sildenafil en tiras de CCH (A). Efecto del sildenafil sobre la acumulación de GMP_c y la influencia de L-NNA (100 μM) y ODQ (20 μM) sobre dicho efecto (B). Efecto de ODQ (20 μM) sobre la relajación inducida por el 8-Bromo-GMP_c (1 nM a 100 μM) en tiras de CCH contraídas con PE (C). Efecto del bloqueo de los K_{Ca} con CTX (100 nM) y APA (100 nM) sobre las relajaciones inducidas por el sildenafil (1 nM a 10 μM), en tiras de CCH contraídas con PE (D). Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la relajación máxima inducida por papaverina (0,1 mM) al final del experimento o como la media \pm E.E. de los pmoles de GMP_c por miligramo de proteína del tejido (B). n indica el número de pacientes de los que se obtuvieron los tejidos para los experimentos. El grupo de datos de D incluyó un paciente diabético ** indica $p < 0,01$ versus control, *** indica $p < 0,001$ versus control por un test ANOVA de dos factores. En B, * indica $p < 0,05$ versus control, † $p < 0,05$ versus sildenafil por un test ANOVA de un factor seguido de un test Student-Newman-Keuls.

El sildenafil también causó una relajación dependiente de la concentración en las tiras de CCH contraídas con PE. Esta relajación fue significativamente reducida tanto por la inhibición de la NO sintasa por L-NNA (100 μM) como por la inhibición de la GCs por ODQ (20 μM); (fig. 23A). En

concordancia con estos resultados, el incremento de los niveles de GMP_C causado por el sildenafil (10 μM) en CCH se redujo cuando se trataron las muestras con L-NNA (100 μM) o con ODQ (20 μM) (fig. 23B). Sin embargo, la relajación al 8-Br-GMPc (1 nM a 100 μM) no se vio afectada por la presencia de ODQ (20 μM) (fig. 23C). Contrariamente a lo observado en las ARPH, el bloqueo de los K_{Ca} con CTX (100 nM) y APA (100 nM); (fig. 23D) no afectó la relajación inducida por sildenafil. Además, incluso a altas concentraciones, de ambos activadores, NS-8 (30 μM) y NS1619 (30 μM), no modificaron dichas relajaciones en CCH (fig. 24A y 24B). Del mismo modo, el activador NS-8 (30 μM) no potenció el efecto vasodilatador del análogo estable del GMP_C , 8-Br-GMPc, en el CCH (fig. 24C).

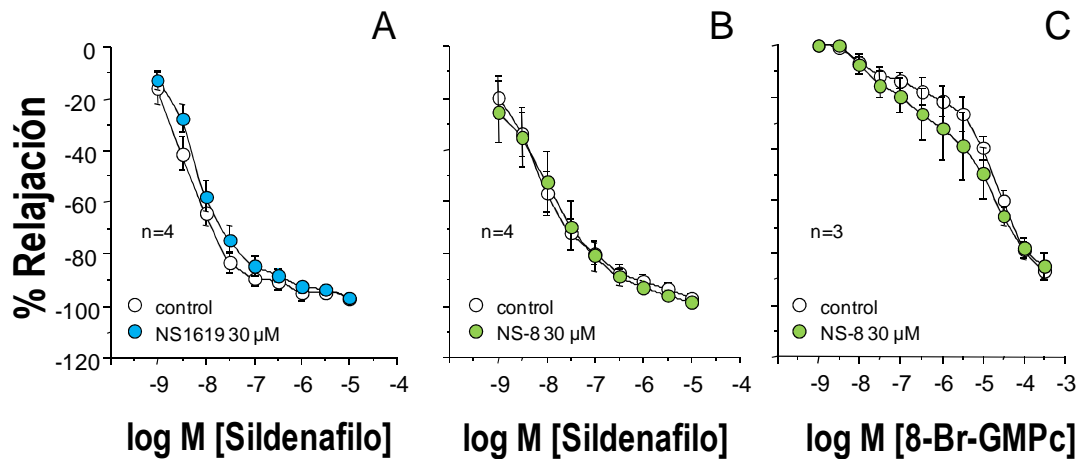


Fig. 24. Efecto del tratamiento con los activadores de los K_{Ca} , NS1619 (30 μM) (A) y NS-8 (30 μM) (B) sobre la relajación inducida por el sildenafil (1 nM a 10 μM), en tiras de CCH contraídas con PE. Efecto del NS-8 (30 μM) sobre la relajación inducida por el 8-Br-GMPc (1 nM a 300 μM) en las tiras de CCH contraídas con PE. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la relajación máxima inducida por papaverina (0,1 mM) al final del experimento. n indica el número de pacientes de los que se obtuvieron los tejidos para los experimentos. Los grupos de datos de A y B incluyeron dos pacientes diabéticos.

Dependencia del endotelio en el efecto inducido por la activación de los K_{Ca} en ARPH

En las ARPH, la eliminación mecánica del endotelio causó una inhibición significativa de la vasodilatación inducida por el sildenafil (fig. 25A) pero esto no afectó a la relajación ejercida por el 8-Br-GMPc (fig. 25B). El bloqueo de los K_{Ca} , con CTX (100 nM) y APA (100 nM), no causó inhibición de la relajación inducida por el sildenafil en arterias carentes de endotelio (fig. 25C). El efecto potenciador del NS-8 desapareció cuando las arterias estuvieron desprovistas de endotelio funcional, es decir, este activador de los K_{Ca} no modificó significativamente las relajaciones inducidas por el sildenafil (fig. 25D) así como tampoco modificó significativamente las relajaciones inducidas por el 8-Br-GMPc en los segmentos arteriales desprovistos de endotelio. (fig. 25E).

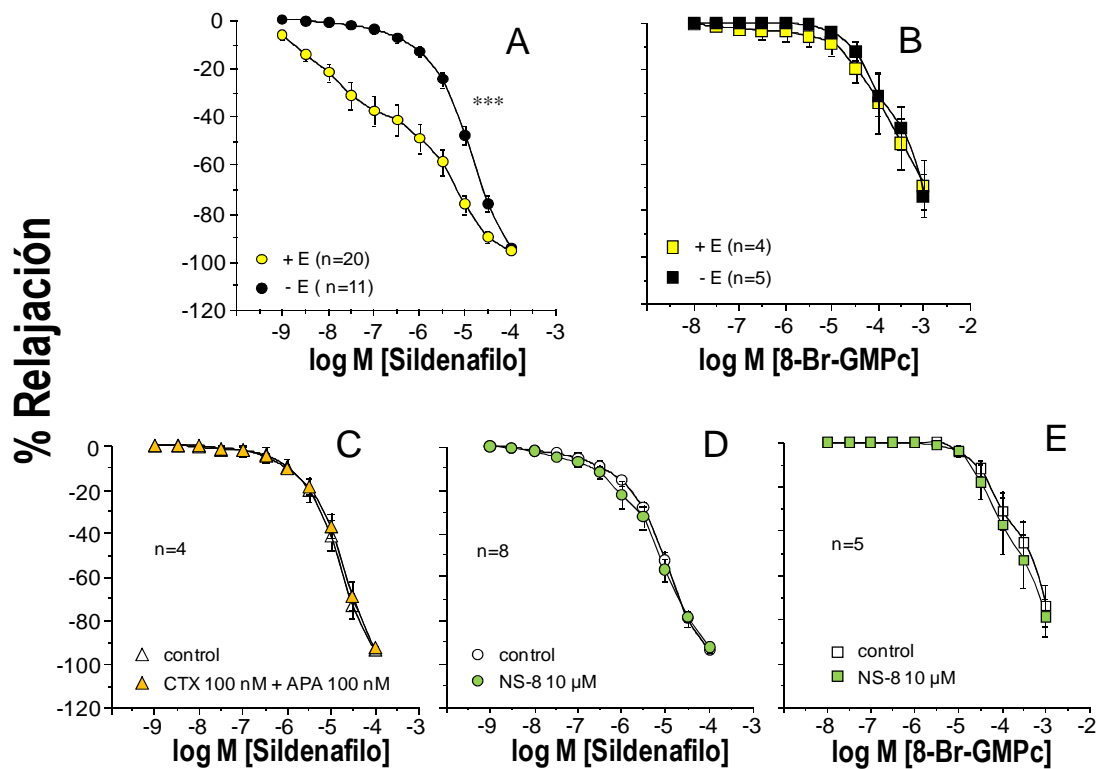


Fig. 25. Efecto de la eliminación del endotelio vascular sobre la relajación inducida por el sildenafil (1 nM a 100 μ M) (A) y sobre la relajación inducida por el 8-Bromo-GMP_C (10 nM a 1 mM) (B) en las ARPH contraídas con NE. Efecto del bloqueo de los K_{Ca} con CTX (100 nM) y APA (100 nM) (C) y la activación de los K_{Ca} con NS8 (10 μ M) (D) sobre la relajación inducida por el sildenafil así como los efectos del NS-8 (10 μ M) sobre la relajación inducida por el 8-Br-GMP_C (E) en las ARPH desendotelizadas (-E). Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la relajación máxima inducida por papaverina (0,1 mM) al final del experimento. n indica el número de pacientes de los que se obtuvieron los tejidos para los experimentos. Los grupos de datos incluyeron 1 (C), 2 (B y E), 3 (D) ó 7 (A) pacientes diabéticos. *** indica $p < 0,001$ versus ARPH con endotelio (+E).

Análisis de los subtipos de K_{Ca} que están implicados en el efecto producido por el NS-8

Para confirmar que el efecto potenciador del NS-8 sobre la actividad relajadora del sildenafil en las arterias peneanas se debía a su acción sobre los K_{Ca}, se trataron las arterias con los bloqueantes de los K_{Ca}, CTX (100 nM) y APA (100 nM). Este bloqueo previno la capacidad potenciadora del NS-8 sobre la relajación inducida por el sildenafil en las ARPH (fig. 26A). A continuación, se analizó la participación específica de los K_{Ca} de gran conductancia (BK), los canales K_{Ca} de intermedia conductancia (IK) y los canales K_{Ca} de baja conductancia (SK) en el efecto potenciador del NS-8 en ARPH. Para ello, se evaluaron los efectos del tratamiento con iberiotoxina (IbTx; 100 nM, bloqueante específico de los BK) (fig. 26B), TRAM-34 (1 μ M, bloqueante específico de los IK) (fig. 26C) y APA (100

Resultados

nM, bloqueante específico de los SK) sobre el efecto potenciador del NS-8 (10 μ M) sobre las respuestas a sildenafil (fig. 26D, respectivamente). El efecto potenciador del NS-8, sobre la relajación inducida por el sildenafil en ARPH, se vio abolido por el tratamiento tanto con IbTx como con TRAM-34, algo que no ocurrió con APA.

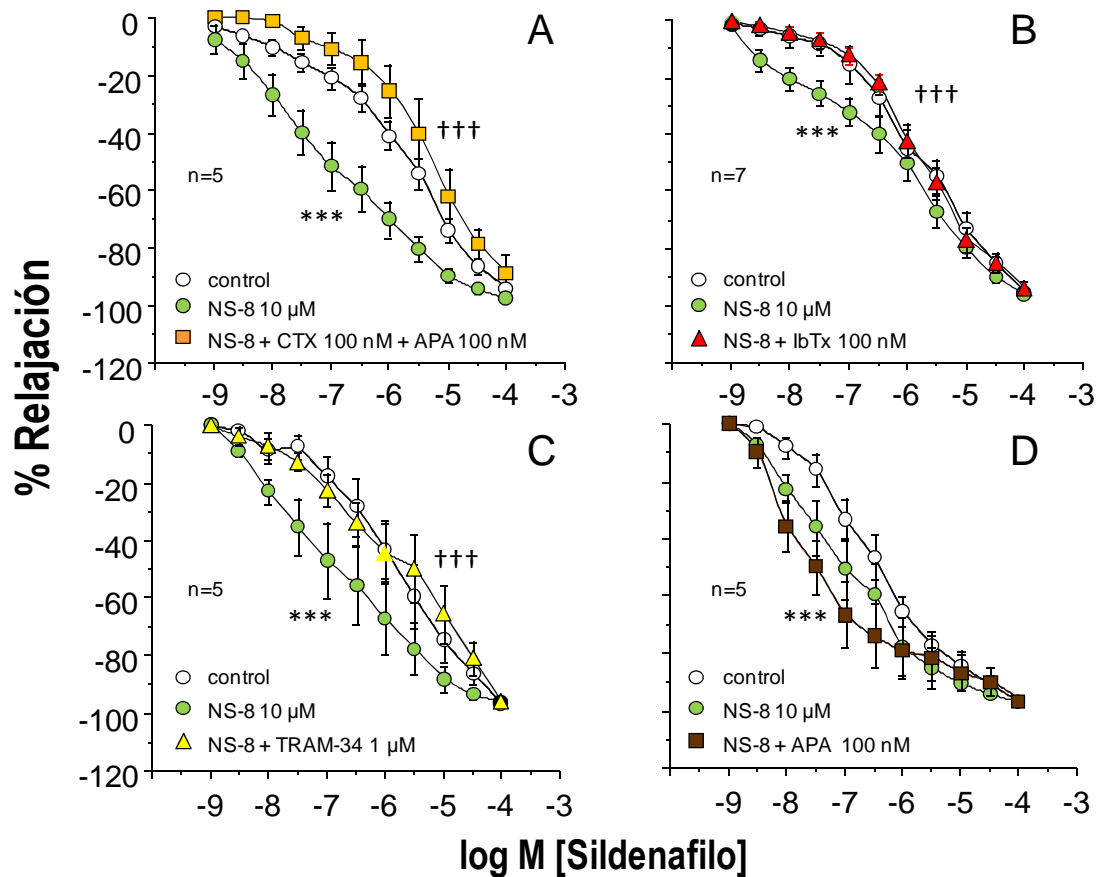


Fig. 26. Efecto del bloqueo total de los K_{Ca} con caribdotoxina (CTX; 100 nM) y apamina (APA; 100 nM) (A), del bloqueo específico de los BK con iberiotoxina (IbTx; 100 nM) (B), los canales IK con TRAM-34 (1 μ M) (C) y los canales SK con APA (100 nM) (D) sobre el efecto potenciador del NS-8 (10 μ M) en la relajación inducida por el sildenafil (1 nM a 100 μ M), en las ARPH contraídas con NE. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la relajación máxima inducida por papaverina (0,1 mM) al final del experimento. n indica el número de pacientes de los que se obtuvieron los tejidos para los experimentos. *** indica $p < 0,001$ versus control y ††† $p < 0,001$ versus NS-8 por un test ANOVA de dos factores.

Expresión y distribución de los K_{Ca} en el endotelio y músculo liso tanto en las ARPH y en el CCH como en tejido peneano de rata revelado por inmunohistoquímica

Los estudios inmunohistoquímicos revelaron en las ARPH una expresión intensa de los BK, IK y SK3. Estos tres tipos de canales estuvieron presentes en músculo liso arterial aunque la presencia de BK fue más intensa (fig. 27A, 27B y 27C). Los subtipos SK1 y SK2 no se detectaron en las ARPH (fig. 29A y 29B). Se detectó una intensa expresión del BK en el endotelio de las arterias peneanas de rata mientras que el IK y el SK3 se localizaron pero mostraron una expresión más débil que los BK (fig. 27F, 27G y 27H).

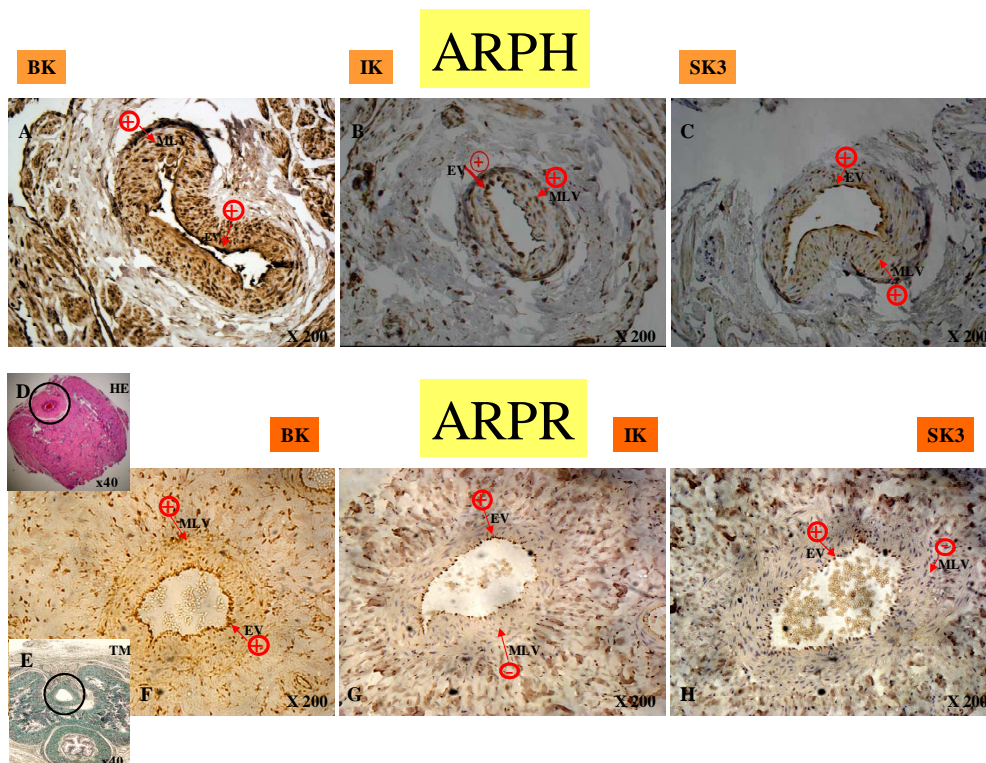


Fig. 27. Detección inmunohistoquímica de los subtipos de K_{Ca} en tejidos eréctiles humanos y de rata. Los BK (A) y los IK (B) se detectaron en el endotelio (EV) y músculo liso vascular (MLV) de las ARPH pero la expresión de los IK fue más intensa en el endotelio. SK3 (C) se expresa en las ARPH, preferentemente en el endotelio. Imagen de hematoxilina-eosina (HE; x 40) (D) y de tricrómico de Masson (TM; x40) (E) de sección de pene de rata. Como en las ARPH, los BK se detectaron en el endotelio y en el músculo liso de las arterias peneanas de rata (F) mientras que los IK (G) y los SK3 (H) sólo se detectaron en el endotelio de estos vasos. La inmunoreactividad aparece en marrón (Diaminobencidina, DAB) señalada con flechas en los diferentes paneles. Las microfotografías son representativas de al menos tres pacientes diferentes o animales. El aumento original es de x200.

Resultados

En el CCH, tanto los BK, los IK como el SK3 se expresan en el músculo liso y en el endotelio de los espacios lacunares. A pesar de su falta de influencia funcional sobre las relajaciones inducidas por el inhibidor de la PDE5, los BK, IK y SK3 se expresaron intensamente en el endotelio y en el músculo liso del CCH (fig. 28A, 28B y 28C). El patrón de expresión de los K_{Ca} en el cuerpo cavernoso de rata (CCR) fue muy diferente. Entre todos los tipos de K_{Ca} , sólo los BK se expresan claramente tanto en el músculo liso como en el endotelio del tejido cavernoso de rata. Sin embargo, no son muy concluyentes las imágenes obtenidas de los IK y SK3 ya que no se observa un patrón de distribución claro y conciso (fig. 28D, 28E y 28F).

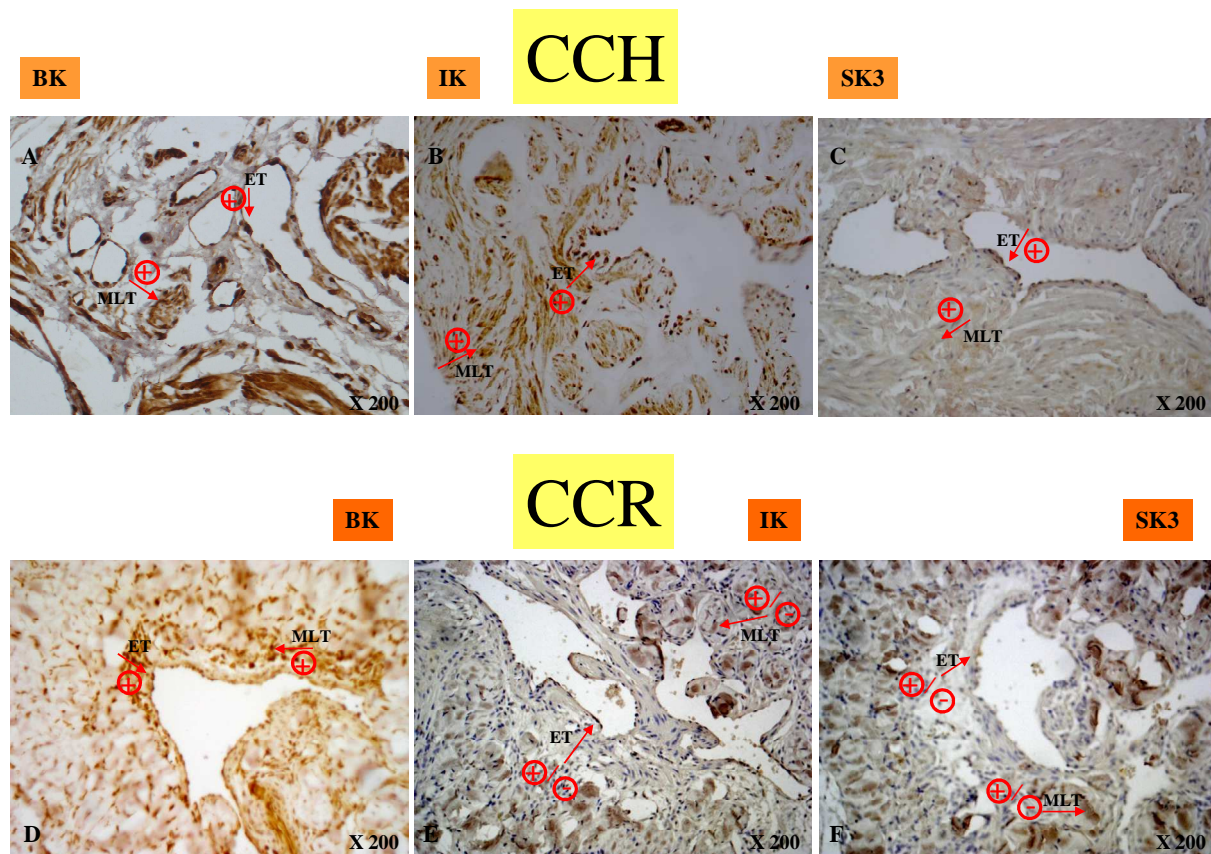


Fig. 28. Inmunodetección de los subtipos de K_{Ca} en CCH y CCR. Los diferentes K_{Ca} están marcados con sus respectivos anticuerpos tanto en el endotelio trabecular (ET) como en el músculo liso trabecular (MLT). Los canales BK (A), IK (C) y SK3 (C) están presentes en las fibras musculares lisas y en el endotelio de los espacios lacunares en el CCH mientras sólo los BK se detectaron en el endotelio y en el músculo liso del CCR (D). Las células positivas están marcadas en marrón y se señalizan con flechas en los diferentes paneles. Las microfotografías son representativas de al menos tres pacientes diferentes o animales. El aumento original es de x200.

Resultados

Se llevaron también a cabo estudios inmunohistoquímicos en ausencia del anticuerpo primario. Las microfotografías revelaron la ausencia de inmunoreactividad (control negativo) en estas condiciones (fig. 29C y 29D).

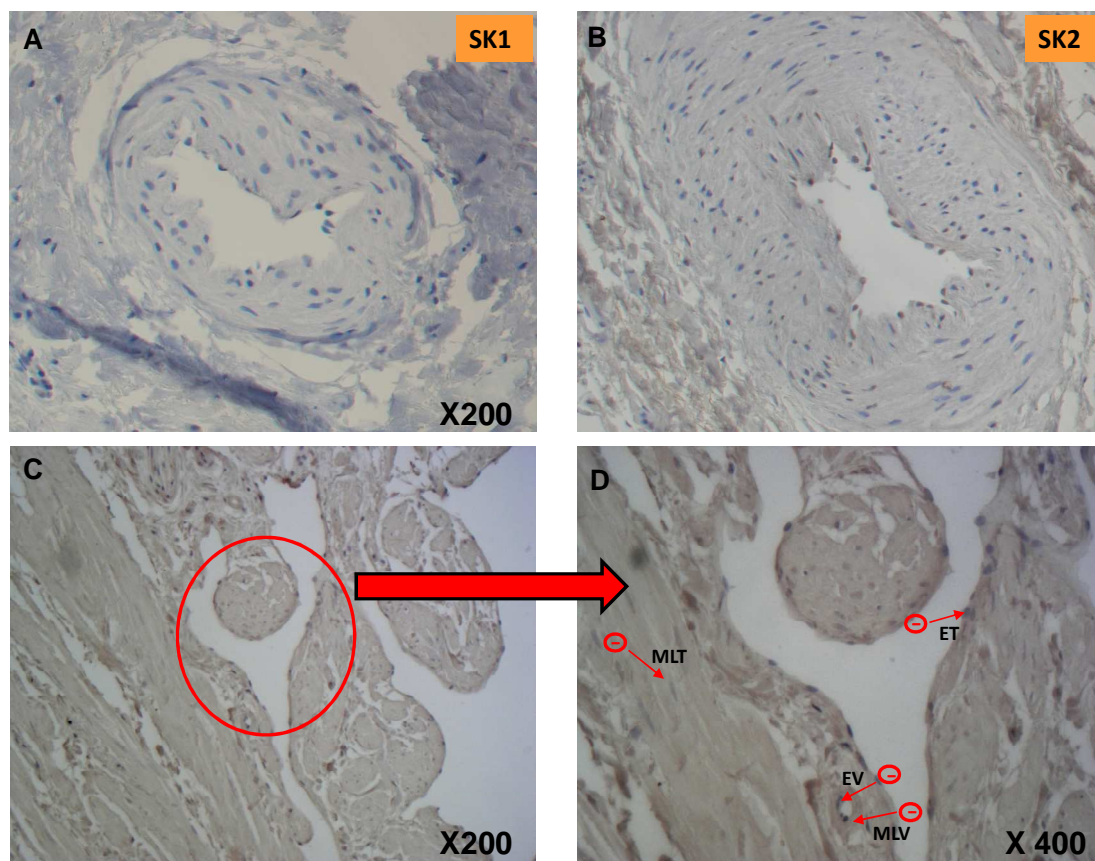


Fig. 29. Localización inmunohistoquímica de los SK1 y SK2 en secciones de ARPH. Los SK1 (A) y SK2 (B) no se detectaron en las ARPH. En los paneles inferiores se muestra el control negativo (en ausencia de anticuerpo primario) del marcaje de los K_{Ca} en endotelio vascular (EV), músculo liso vascular (MLV), endotelio trabecular (ET) y músculo liso trabecular (MLT). Panel D aumento (x 400) de la zona señalizada del panel C (x 200).

Efectos de la activación de los K_{Ca} y la inhibición de la PDE5 sobre las respuestas eréctiles *in vivo*

Una vez comprobado que los activadores de los K_{Ca} potencian el efecto de la inhibición de la PDE5 *in vitro*, se evaluó el efecto *in vivo* de la administración intravenosa de los activadores de los K_{Ca} sobre las respuestas eréctiles producidas por la estimulación eléctrica del nervio cavernoso en rata y su interacción con los efectos de la inhibición de la PDE5 en este modelo.

Efecto del sildenafil y los activadores de los K_{Ca} sobre la presión arterial sistémica en ratas

La administración intravenosa del activador de los K_{Ca} , NS1619 a 5 mg/kg, no alteró significativamente la presión arterial (PA) sistémica en ratas no diabéticas (fig. 30A). La administración de NS-8 a 5 mg/kg causó un moderado ($< 10\%$) y transitorio (se restableció en menos de un minuto) descenso de la PA (fig. 30B). El moderado efecto de los activadores de los K_{Ca} sobre la PA es totalmente distinto al causado por la activación de los K_{ATP} . Así, la administración intravenosa de pinacidil (0,1 mg/kg) en estos animales causó un efecto hipotensor notable y mantenido ($-27,03 \pm 2,89\%$ de cambio en la presión arterial media (PAM), $n=6$) (fig. 30C). La administración intravenosa del sildenafil causó un efecto hipotensor significativo en las ratas no diabéticas ($-14,2 \pm 2,7\%$ y $-21,1 \pm 2,7\%$ de cambio en la PAM para 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg, respectivamente), pero este efecto hipotensor fue transitorio ya que la PA alcanzó el valor previo a la administración del fármaco pasados 15-25 min (fig. 30D). En las ratas diabéticas, el sildenafil (0,3 mg/kg) causó un efecto sobre la PA similar al observado en las ratas no diabéticas ($-19,0 \pm 3,72\%$ de la PAM). La administración previa del sildenafil no alteró los efectos sobre la PA de los activadores de los K_{Ca} , NS1619 0.3 mg/kg y 5 mg/kg y NS-8 0,3 mg/kg y 5 mg/kg, (administrados 30 min después de la administración del sildenafil), ni en ratas no diabéticas ni en ratas diabéticas.

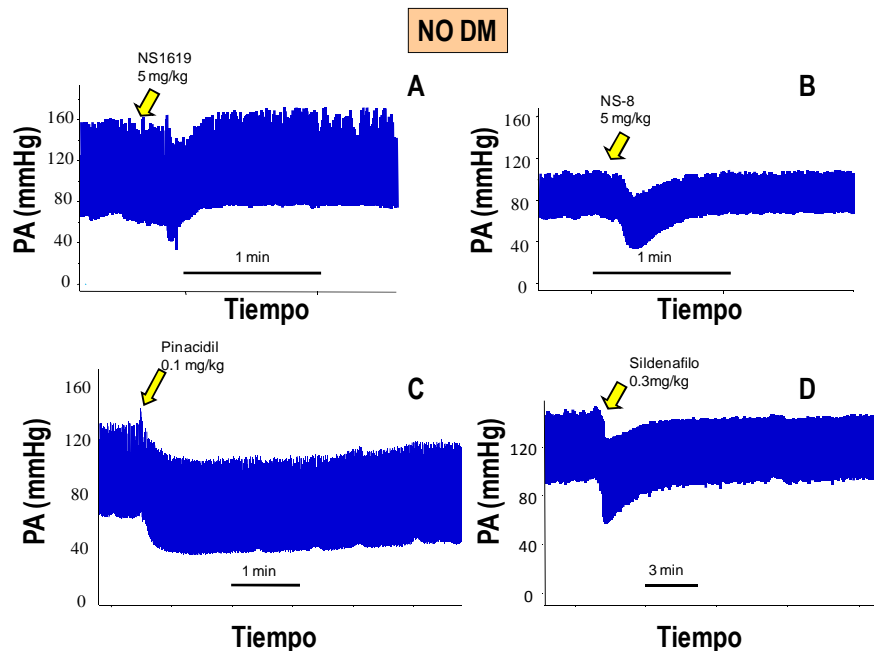


Fig. 30. Trazados de presión arterial (PA, mmHg) en ratas anestesiadas no diabéticas que muestran el efecto de los activadores de los K_{Ca} , NS1619 5 mg/kg (A) y NS-8 5 mg/kg (B), del activador de los K_{ATP} , pinacidil (0,1 mg/kg) (C) y del sildenafil (0,3mg/kg) (D), sobre la PA sistémica en ratas no diabéticas.

Efectos del sildenafil, un activador de los K_{Ca} y la combinación de ambos sobre las respuestas eréctiles *in vivo* en ratas

La estimulación eléctrica del nervio cavernoso en las ratas anestesiadas produjo un incremento en la presión intracavernosa (PIC) que fue dependiente de la frecuencia. El tratamiento con el vehículo (15% HP β CD) no modificó estas respuestas eréctiles en ratas no diabéticas (fig. 31A y 31B). La cuantificación de la PIC normalizada por la PAM tras la administración venosa del vehículo corrobora la no modificación de las respuestas eréctiles tras el tratamiento con el vehículo, en ratas no diabéticas anestesiadas (fig. 31C).

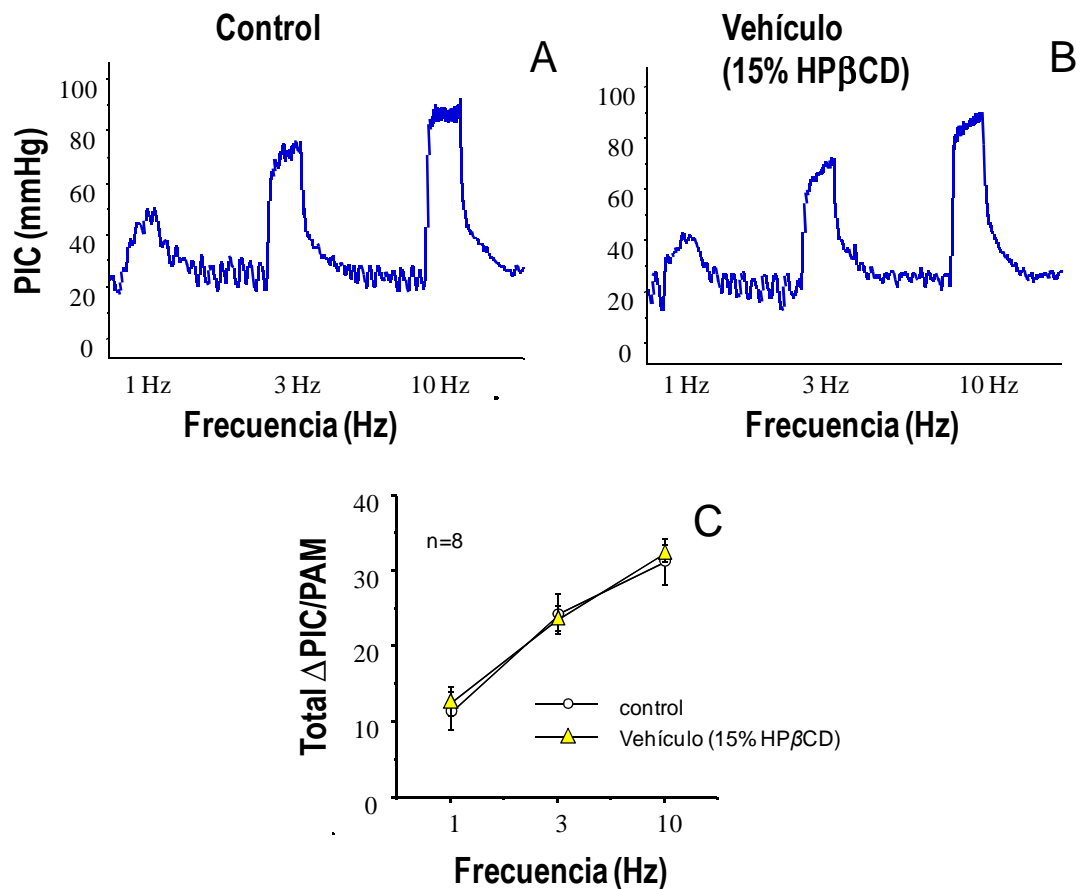


Fig. 31. Trazado de los incrementos de presión intracavernosa (PIC, mmHg) inducidas por la estimulación eléctrica del nervio cavernoso a frecuencias crecientes (1, 3 y 10 Hz) en ratas no diabéticas anestesiadas antes (A) y después (B) de la administración intravenosa del vehículo (15% HP β CD). El panel C muestra la cuantificación de estos resultados. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del área bajo la curva (AUC) del incremento de la PIC normalizado por el valor de la PAM para cada estimulación. n indica el número de animales utilizados.

En ratas no diabéticas, la administración intravenosa de una dosis baja del sildenafil (0,1 mg/kg), no modificó significativamente las respuestas eréctiles (fig. 32A). Sin embargo, una dosis más alta de

Resultados

sildenafil (0.3 mg/Kg) potenció significativamente las respuestas eréctiles (fig. 32B). De la misma manera, la administración intravenosa del activador de los K_{Ca} , NS1619 a la dosis de 0,3 mg/kg, no modificó significativamente las respuestas eréctiles a la estimulación eléctrica del nervio cavernoso. Sin embargo, una dosis más alta del activador (5 mg/kg) fue capaz de mejorar significativamente las respuestas eréctiles (fig. 32C). Otro activador de los K_{Ca} , NS-8, tampoco modificó significativamente las respuestas eréctiles a la estimulación eléctrica del nervio cavernoso en ratas no diabéticas cuando se administró a 0,3 mg/kg pero tras la dosis de 5 mg/kg potenció significativamente dichas respuestas (fig. 32D). No obstante, aunque administrados por separado no mostraron efecto, la combinación de sildenafil 0,1 mg/Kg y NS-8 0,3 mg/Kg causó una potenciación significativa de las respuestas eréctiles (fig. 32E).

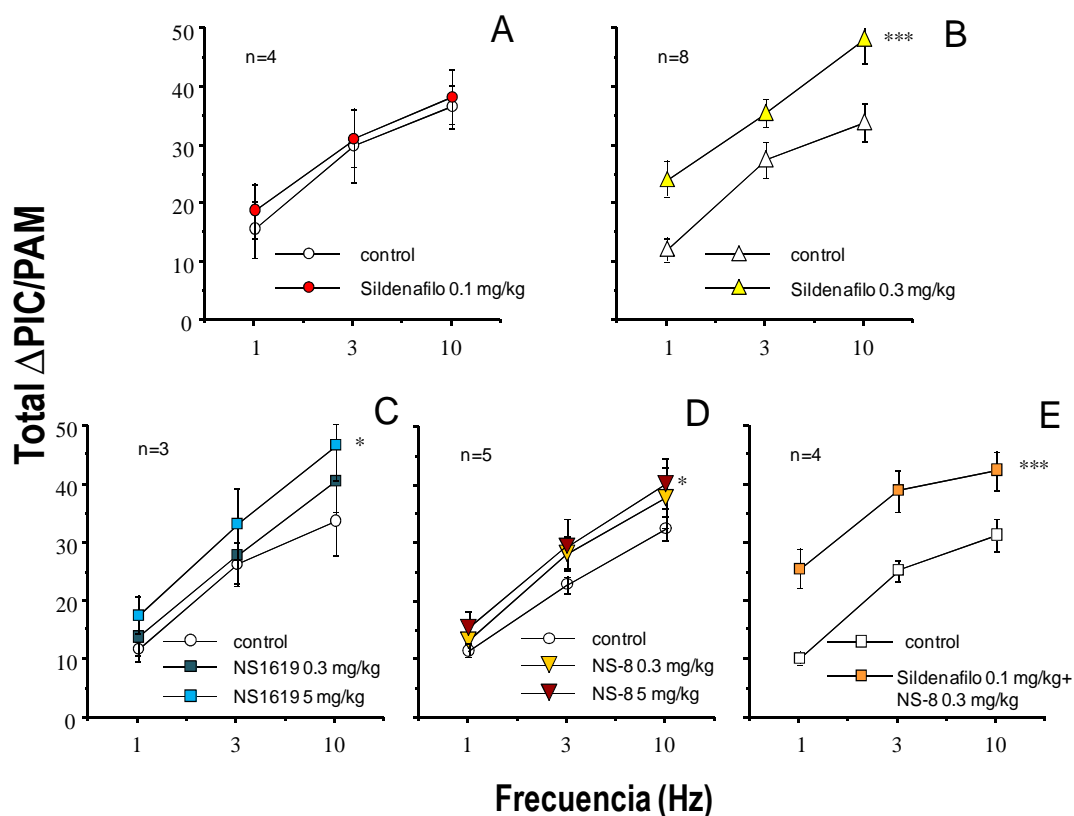


Fig. 32. Efectos de la administración intravenosa del sildenafil (0,1 y 0,3 mg/kg) (A y B, respectivamente), y los activadores de los K_{Ca} , NS1619 (0,3 mg/kg y 5 mg/kg) (C) y NS-8 (0,3 mg/kg y 5 mg/kg) (D) y la combinación de sildenafil 0,1 mg/kg y NS-8 0,3 mg/kg sobre las respuestas eréctiles inducidas por la estimulación eléctrica del nervio cavernoso en ratas no diabéticas anestesiadas. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del área bajo la curva (AUC) del incremento de la presión intracavernosa (PIC) normalizado por el valor de la presión arterial media (PAM) para cada estimulación. n indica el número de animales utilizados para cada experimento. * indica $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ versus respuestas control por un test ANOVA de dos factores.

Impacto de la diabetes sobre la vía del NO/GMP_c en el tejido eréctil de pacientes con DE

Impacto de la diabetes sobre la relajación endotelial en CCH y ARPH de pacientes con DE

La exposición a ACh produjo una relajación dependiente de la concentración (1 nM a 10 μ M) de las ARPH contraídas con NE y del tejido de CCH contraído con PE. Se observó una reducción de la relajación a ACh en el CCH y las ARPH de los pacientes con DE, cuando se comparó con la obtenida en CCH y ARPH procedentes de donantes de órganos (fig. 33A y 33B). Cuando los tejidos eréctiles de los pacientes con DE se segregaron en función de la presencia o ausencia de diabetes, se observó que si bien las tiras de CCH y las ARPH de los pacientes no diabéticos exhibían una reducida relajación endotelial, el deterioro de la relajación endotelial era significativamente más acentuado en el CCH y las ARPH de los pacientes diabéticos. Es decir, el deterioro de la relajación endotelial observado en el tejido eréctil de los pacientes con DE, se ve exacerbado con la presencia de diabetes, un efecto evidenciado tanto en el CCH como en las ARPH (fig. 33C y 33D).

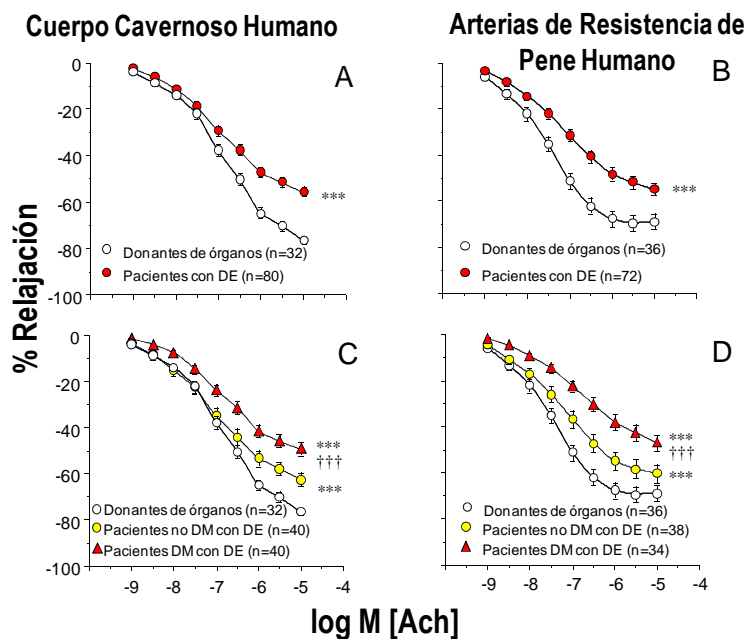


Fig. 33. Relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina (ACh; 1nM a 10 μ M) en tiras de CCH contraídas con PE (1-3 μ M) (A) y en ARPH contraídas con NE (1-5 μ M) (B) procedentes de DO y de pacientes con DE. En las gráficas C y D, los tejidos de los pacientes con DE, de CCH y de ARPH, respectivamente, se segregan en pacientes no diabéticos y

pacientes diabéticos con DE. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de relajación máxima inducida por papaverina (0,1 mM) al final del experimento. n indica el número de pacientes de los que se obtuvieron los tejidos. *** p < 0,001 versus DO, ††† p < 0,001 versus pacientes no diabéticos con DE por un test ANOVA de dos factores.

Puesto que la edad de los DO era significativamente menor que la de los pacientes con DE, se analizó la influencia de este hecho en el deterioro de la relajación endotelial observado en el tejido eréctil de los pacientes con DE. Para ello, se dividió el grupo de DO en un subgrupo de donantes con edad inferior a 50 años y otro subgrupo de donantes con edad igual o superior a 50 años. La media de edad de este último subgrupo ($55 \pm 6,3$ años) era comparable a la que presentaban los pacientes con DE, diabéticos ($56 \pm 4,4$ años) o no diabéticos ($57 \pm 7,7$ años). La relajación máxima a ACh ($10 \mu\text{M}$) en el CCH y las ARPH de esta subpoblación de DO (> 50 años) fue similar a la obtenida en tejidos de los DO más jóvenes (< 50 años) y significativamente mayor que la obtenida en el CCH y las ARPH de los pacientes no diabéticos con DE que, a su vez, era superior a la de los pacientes diabéticos con DE (fig. 34 A y 34 B, respectivamente).

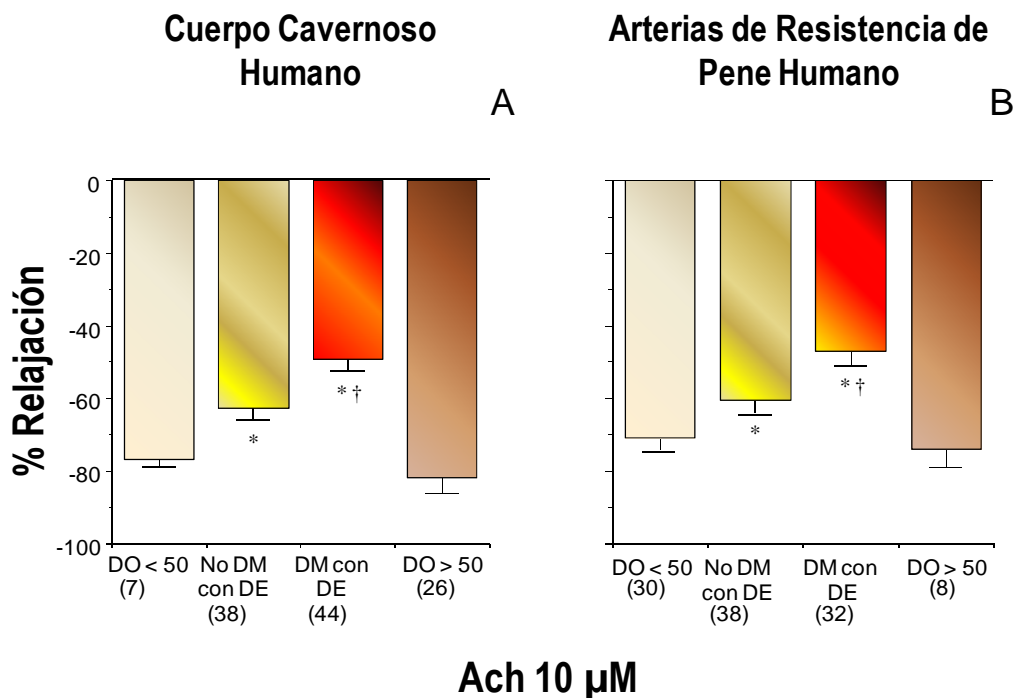


Fig. 34. Relajación dependiente de endotelio inducida por ACh ($10 \mu\text{M}$) en tiras de CCH contraídas con PE ($1-3 \mu\text{M}$) (A) y en ARPH contraídas con NE ($1-5 \mu\text{M}$) (B) procedentes de DO y de pacientes diabéticos y de pacientes no diabéticos con DE. Los DO se dividieron en dos grupos según su edad: menores de 50 años (DO < 50) y mayores de 50 años (DO > 50). Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la relajación máxima inducida por papaverina ($0,1 \text{ mM}$) al final del experimento. El número de pacientes de los que se obtuvieron los tejidos aparece entre paréntesis. * $p < 0,05$ versus DO (ambos subgrupos), † $p < 0,05$ versus pacientes no diabéticos con DE por un test ANOVA de un factor seguido de un test Student –Newman-Keuls.

Impacto de la diabetes sobre la relajación neurogénica del cuerpo cavernoso humano y de las arterias de resistencia de pene humano

La aplicación de la EET en las ARPH contraídas con NE produjo relajaciones dependientes de la frecuencia que eran sensibles a la inhibición de la síntesis de NO, con L-NNA (100 μ M) (fig. 35). Estas relajaciones neurogénicas se vieron disminuidas en el CCH y las ARPH procedentes de pacientes con DE, tanto en los pacientes diabéticos como en los no diabéticos, comparadas con las de los DO (fig. 36A y 36B). Sin embargo, el CCH y las ARPH de los pacientes diabéticos presentaron unas relajaciones neurogénicas significativamente reducidas con respecto a los tejidos de pacientes no diabéticos. Es decir, el deterioro de la relajación neurogénica observado en el tejido eréctil de los pacientes con DE, se ve agravado con la presencia de diabetes, un efecto evidenciado tanto en el CCH como en las ARPH.

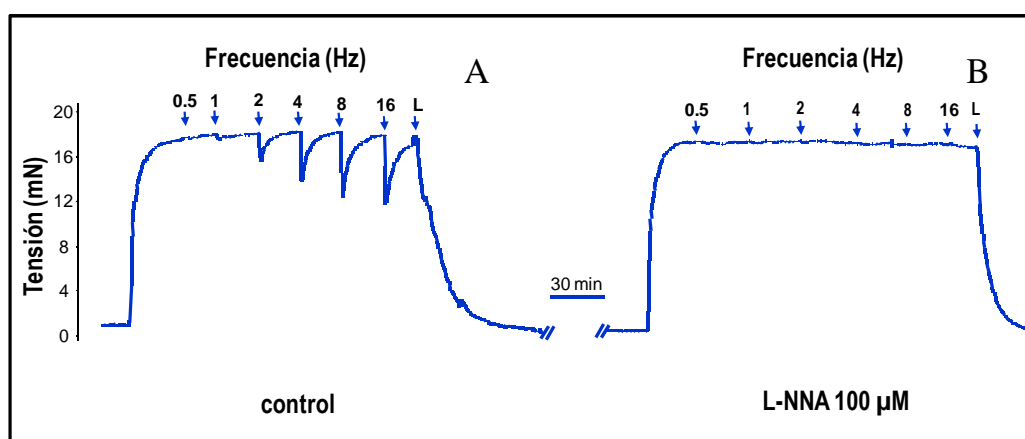


Fig. 35. Registro de la EET en ARPH. A) Curva control de estimulación/respuesta a las frecuencias de 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 Hz (75 mA, 0.5 ms durante 20 s.). B) Curva de estimulación eléctrica en la misma ARPH tras preincubar con L-NNA 100 μ M.

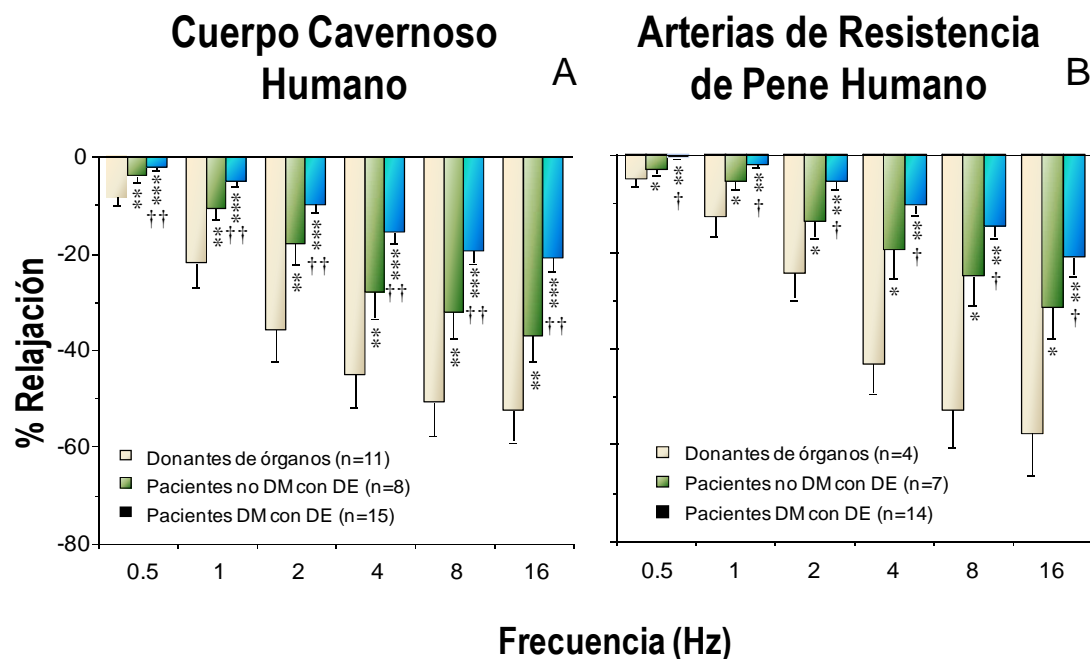


Fig. 36. Relajación neurogénica nitrérgica a la EET (0,5 a 16 Hz) en tiras de CCH contraídas con PE (1-3 μ M) (A) y en ARPH contraídas con NE (1-5 μ M) (B) procedentes de DO y de pacientes no diabéticos y diabéticos con DE. Las tiras de tejidos se trataron con 0.1 μ M de atropina y 10 μ M de guadetidina. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la relajación máxima inducida por papaverina (0.1 mM) al final del experimento. n indica el número de los pacientes de los que se obtuvieron los tejidos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. * $p < 0,001$ versus los DO, † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ versus pacientes no diabéticos con DE por un test ANOVA de dos factores.**

Impacto de la diabetes sobre las relajaciones mediadas por un donador de NO en CCH y en ARPH

La exposición al donador de NO, nitroprusiato sódico (NPS) indujo una relajación dependiente de la concentración tanto en tiras de CCH (1 nM a 1 μ M) como en ARPH (1 nM a 100 μ M). No hubo diferencias significativas en las relajaciones inducidas por el NPS en CCH y ARPH procedentes de DO, pacientes no diabéticos con DE o pacientes diabéticos con DE (fig. 37A y 37B).

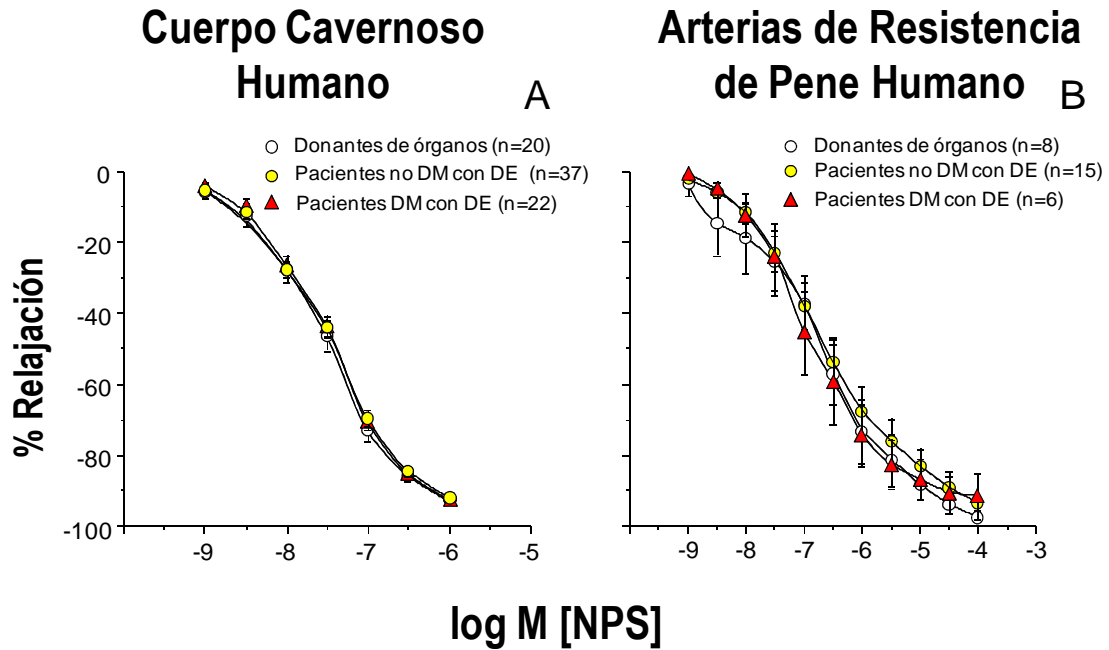


Fig. 37. Relajación inducida por el donador de NO, nitroprusiato sódico (NPS; 1nM a 1μM) en tiras de CCH contraídas con PE (1-3 μM) (A) y en ARPH (NPS; 1nM a 100 μM) contraídas con NE (1-5 μM) (B) procedentes de DO y de pacientes con DE que se segregan en pacientes diabéticos con DE y no diabéticos con DE. n indica el número de los pacientes de los que se obtuvieron los tejidos.

Impacto de la diabetes sobre el contenido de GMP_C en el CCH

El contenido basal de GMP_C en CCH procedente de pacientes con DE fue significativamente menor que en tejido procedente de DO (fig. 38A). La exposición de las tiras de CCH a ACh (10 μM) incrementó la concentración de GMP_C , tanto en los DO como en los pacientes con DE, pero, tras la estimulación con ACh, el CCH de los pacientes con DE mostraba una concentración reducida de GMP_C con respecto a los DO (fig. 38A). Cuando los tejidos eréctiles de los pacientes con DE se segregaron en función de la presencia o ausencia de diabetes, se observó que las muestras de CCH de los pacientes no diabéticos presentaban una reducción no significativa en los niveles basales de GMP_C respecto a los DO, pero la reducción de los niveles fue significativamente más acusado en muestras procedentes de pacientes diabéticos (fig. 38B). En comparación con los DO, el contenido de GMP_C después de la estimulación con ACh también fue ligeramente inferior en pacientes no diabéticos pero estaba significativamente reducido en el cuerpo cavernoso de pacientes diabéticos (fig. 38B).

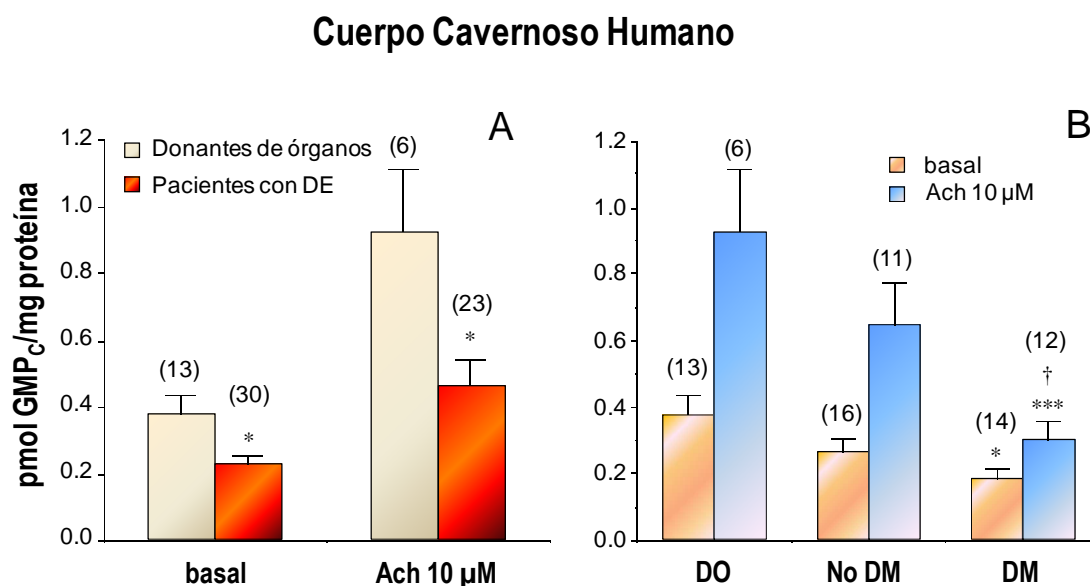


Fig. 38. Contenido de GMP_c en condiciones basales y tras estimulación con ACh (10 μ M) en tiras de CCH procedentes de DO y de pacientes DE (A). Los pacientes con DE se segregaron en pacientes diabéticos y no diabéticos (B). El número de pacientes de los que se obtuvieron los tejidos aparece entre paréntesis. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ versus DO y † $p < 0.05$ versus pacientes no diabéticos con DE por un test ANOVA de dos factores.**

Efecto de la diabetes sobre la relajación inducida por el sildenafil en CCH y en las ARPH

Las tiras de CCH contraídas con PE y las ARPH contraídas con NE se expusieron al sildenafil (1 nM hasta 1 μ M). En el CCH se observó que las relajaciones a sildenafil se vieron deterioradas en pacientes diabéticos con DE comparadas con el tejido procedente de los DO, pero no había diferencias significativas entre pacientes no diabéticos con DE y pacientes diabéticos con DE. Esta relajación a sildenafil no se vio afectada en los pacientes no diabéticos con DE, ya que no se observaron diferencias significativas entre los pacientes no diabéticos con DE y los DO (fig. 39A).

En el caso de las ARPH, las relajaciones inducidas por el sildenafil (1 nM hasta 100 μ M) se vieron deterioradas significativamente en los pacientes no diabéticos con DE comparadas con las relajaciones en los DO. Sin embargo, la diabetes afectó de una manera más acusada a la relajación inducida por el sildenafil en los pacientes con DE, ya que en los pacientes diabéticos la relajación inducida por el sildenafil se encuentra más profundamente deteriorada (fig. 39B). Sin embargo, las relajaciones al 8-Br-GMP_c (10 nM a 1 mM) no se vieron afectadas por la presencia de la diabetes en estos segmentos arteriales (fig. 39C).

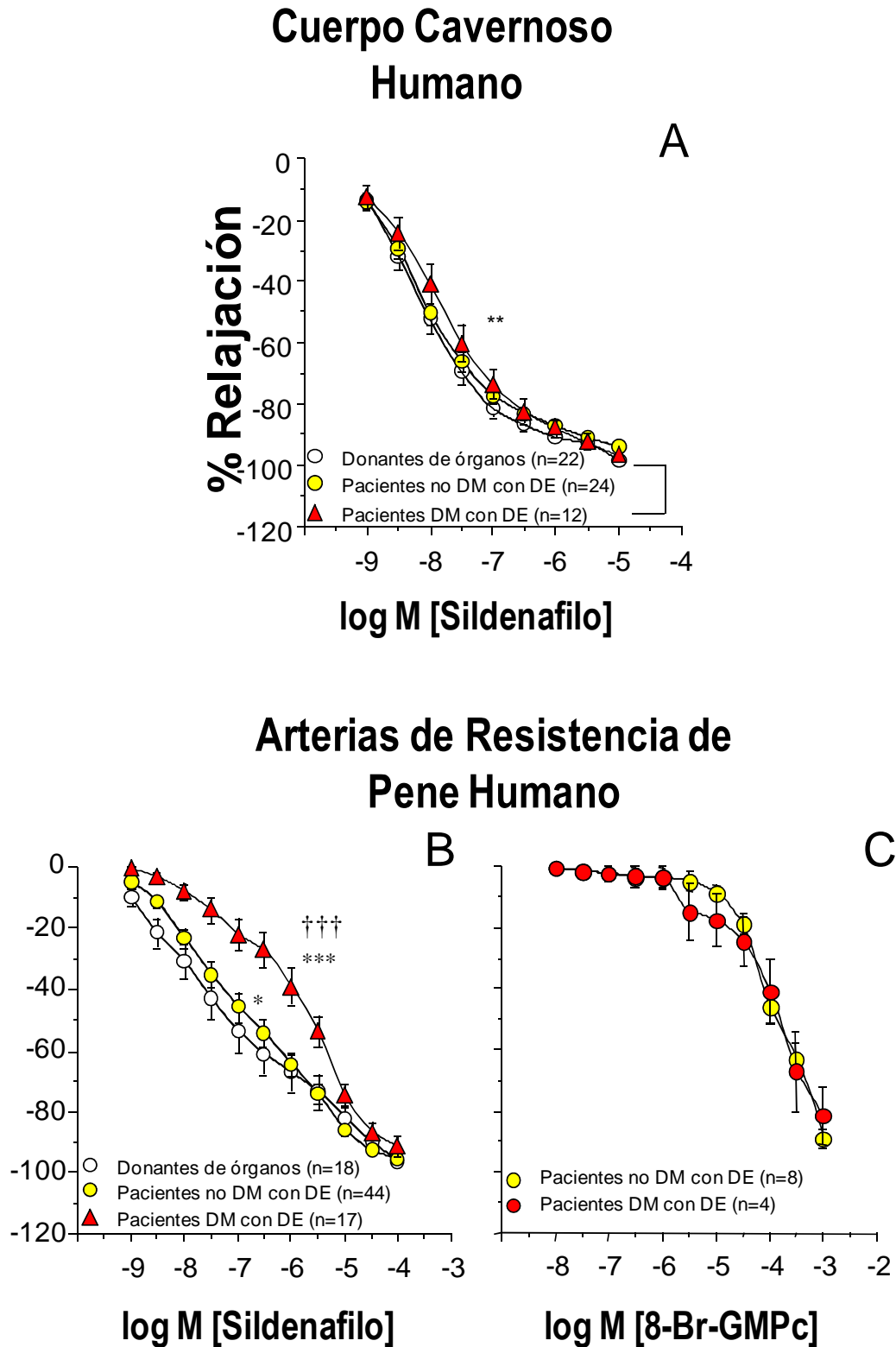


Fig. 39. Relajación inducida por el sildenafil (1nM a 1 μ M) en tiras de CCH contraídas con PE (1-3 μ M) (A) y en ARPH contraídas con NE (1-5 μ M) (B) procedentes de DO y de pacientes no diabéticos y diabéticos con DE. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la relajación máxima inducida por papaverina (0,1 mM) al final del experimento. n indica el número de los pacientes de los que se obtuvieron los tejidos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ vs los DO, ††† $p < 0,001$ versus pacientes no diabéticos con DE por un test ANOVA de dos factores.**

La activación de los canales K_{Ca} revierte el deterioro causado por la diabetes sobre la vasodilatación de las ARPH inducida por el sildenafil

Del mismo modo a lo evidenciado en el estudio de caracterización del impacto de la diabetes sobre el tejido eréctil humano, en esta serie de experimentos también se observó un deterioro significativo de la vasodilatación inducida por sildenafil en las ARPH obtenidas de pacientes diabéticos (fig. 40). El tratamiento con el activador de los K_{Ca} , NS-8 (10 μ M), causó una potenciación significativa de la relajación inducida por sildenafil de las ARPH de pacientes diabéticos y no diabéticos (fig. 41). De hecho, después del tratamiento con NS-8, las relajaciones inducidas por el sildenafil en las ARPH de pacientes diabéticos no fueron diferentes de aquellas obtenidas en las ARPH de pacientes no diabéticos (fig. 41).

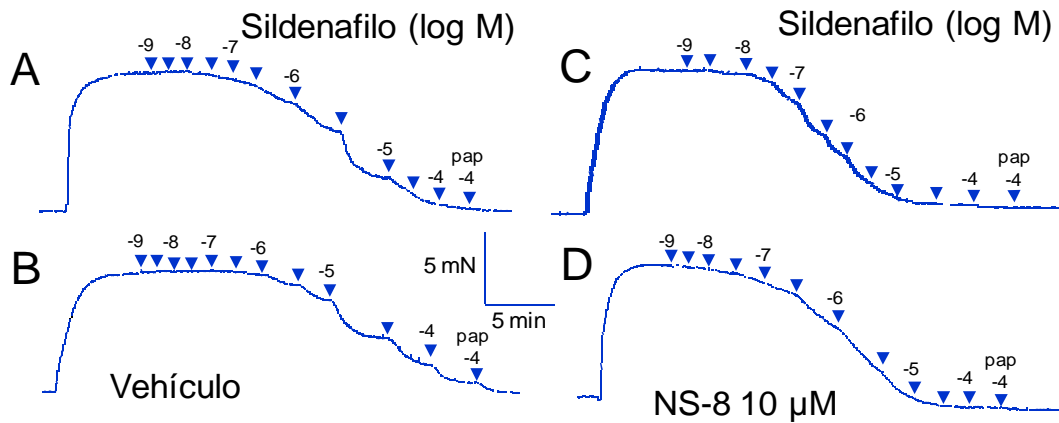


Fig. 40. Trazados de la respuesta vasodilatadora inducida por el sildenafil (1 a 100 μ M), en ARPH contraídas con NE de un paciente no diabético (A) y de un paciente diabético (B). Los paneles C y D muestran los trazados de las relajaciones inducidas por el sildenafil después del tratamiento con NS-8 (10 μ M) en segmentos arteriales en paralelo de los mismos pacientes que en A y B respectivamente.

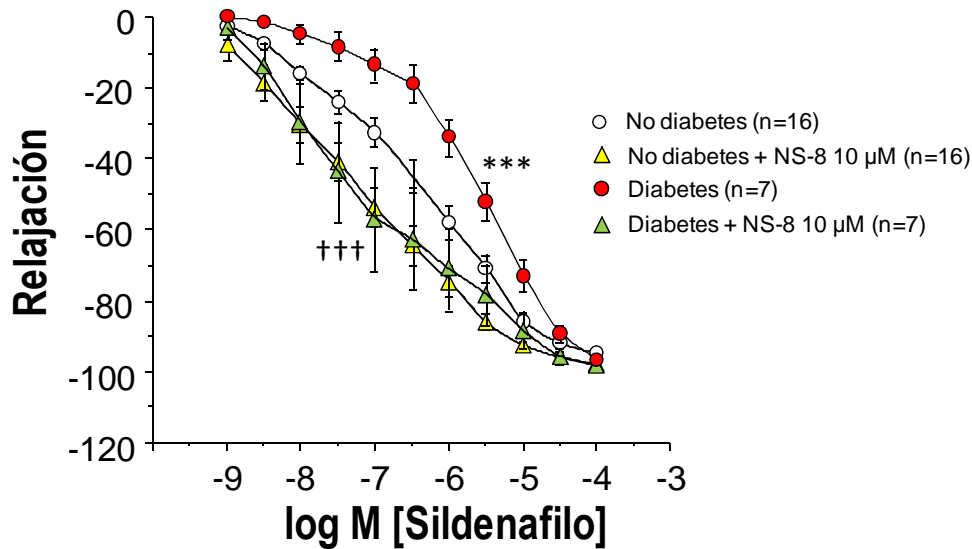


Fig. 41. El panel muestra los efectos de la diabetes y el tratamiento con el activador de los K_{Ca} , NS-8 (10 μ M) sobre la vasodilatación inducida por sildenafil en las ARPH. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la relajación máxima inducida por papaverina (0.1 mM) al final del experimento. n indica el número de pacientes de los que se obtuvieron los tejidos para los experimentos. Dos pacientes no diabéticos no presentaron ningún factor de riesgo cardiovascular (FRCV), ocho presentaron un FRCV y seis tuvieron dos o más FRCV. Cuatro pacientes diabéticos sólo presentaron diabetes como único FRCV mientras que tres tuvieron uno o más FRCV adicional. La edad media fue $57,1 \pm 3,1$ años y $51,9 \pm 2,6$ años para pacientes no diabéticos y diabéticos respectivamente ($p > 0.25$). *** indica $p < 0,001$ versus No diabetes, ††† $p < 0,001$ versus Diabetes por un test ANOVA de dos factores.

La activación de los K_{Ca} aumenta la eficacia de la inhibición de la PDE5 en recuperar la función eréctil en ratas diabéticas

Tras 8 semanas de diabetes, la concentración de glucosa en sangre fue marcadamente elevada en las ratas diabéticas (30,5 versus 4,6 mM en ratas diabéticas y no diabéticas, respectivamente, $p < 0,001$). Los incrementos de la PIC causados por la estimulación eléctrica del nervio cavernoso se vieron significativamente reducidos en las ratas diabéticas en comparación con las ratas no diabéticas (fig. 42A). Al igual que en las ratas no diabéticas, el tratamiento con el vehículo (15% HP β CD) no modificó las respuestas eréctiles en las ratas diabéticas (fig. 42B). La administración intravenosa de los activadores de los K_{Ca} , NS1619 (0,3 mg/kg y 5 mg/kg) ó NS-8 0,3 mg/kg no modificó significativamente las respuestas eréctiles en las ratas diabéticas (Fig. 42C y 42D, respectivamente), sin embargo, el NS-8 5mg/kg ejerció un efecto potenciador significativo de las respuestas eréctiles en las ratas diabéticas.

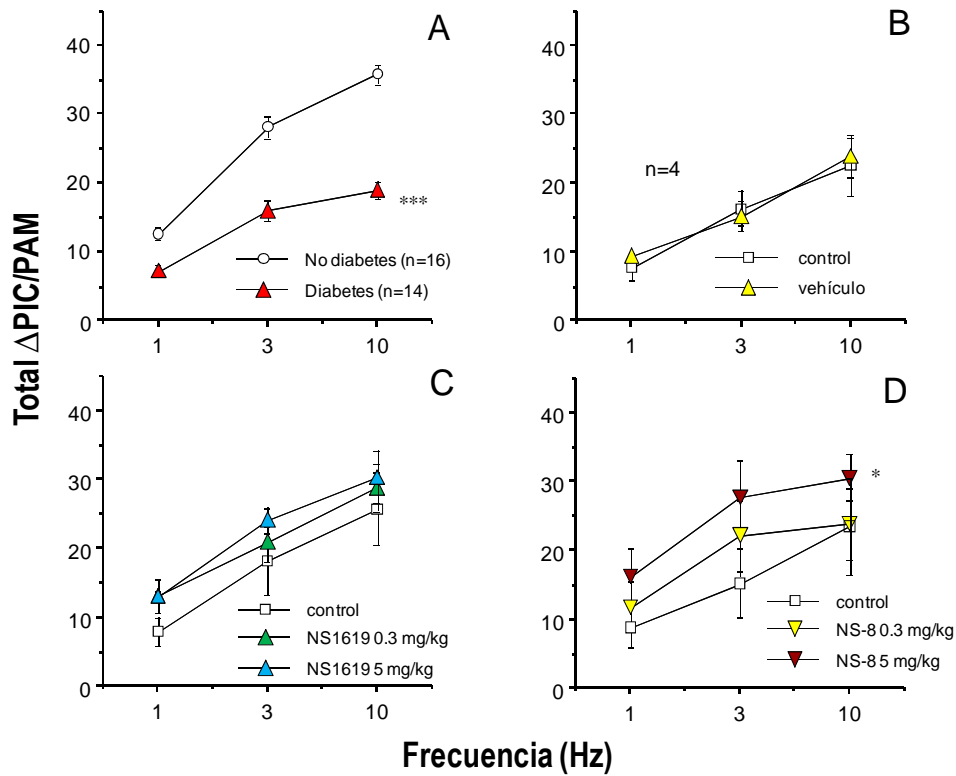


Fig. 42. Efecto de la diabetes sobre las respuestas eréctiles inducidas por la estimulación eléctrica del nervio cavernoso (EET) (A). Efectos de la administración intravenosa del vehículo (15% HPBCD) sobre las respuestas eréctiles en ratas diabéticas (B). Efecto de los activadores de los K_{Ca} , NS1619 (0,3 mg/kg y 5 mg/kg) (C) y NS-8 (0,3 mg/kg y 5 mg/kg) (D) sobre las respuestas a la EET en ratas diabéticas. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del área bajo la curva (AUC) normalizado por el valor de la presión arterial media para cada estimulación. n indica el número de animales utilizados para cada experimento. * indica $p < 0.05$ versus respuestas control.

La administración intravenosa de sildenafil (0,3 mg/kg) mejoró ligeramente las respuestas eréctiles pero no fue capaz de revertir completamente la DE en estos animales (fig. 43). Sin embargo, la administración conjunta de sildenafil (0,3 mg/kg) y un activador de los K_{Ca} (tanto NS1619 como NS-8, ambos a 0,3 mg/kg) produjo una potenciación significativa de las respuestas eréctiles en ratas diabéticas (fig. 43), y consiguió revertir completamente la disfunción eréctil en estas ratas que tras el tratamiento alcanzaron niveles de respuesta eréctil comparables a los obtenidos en los animales no diabéticos (fig. 43).

Resultados

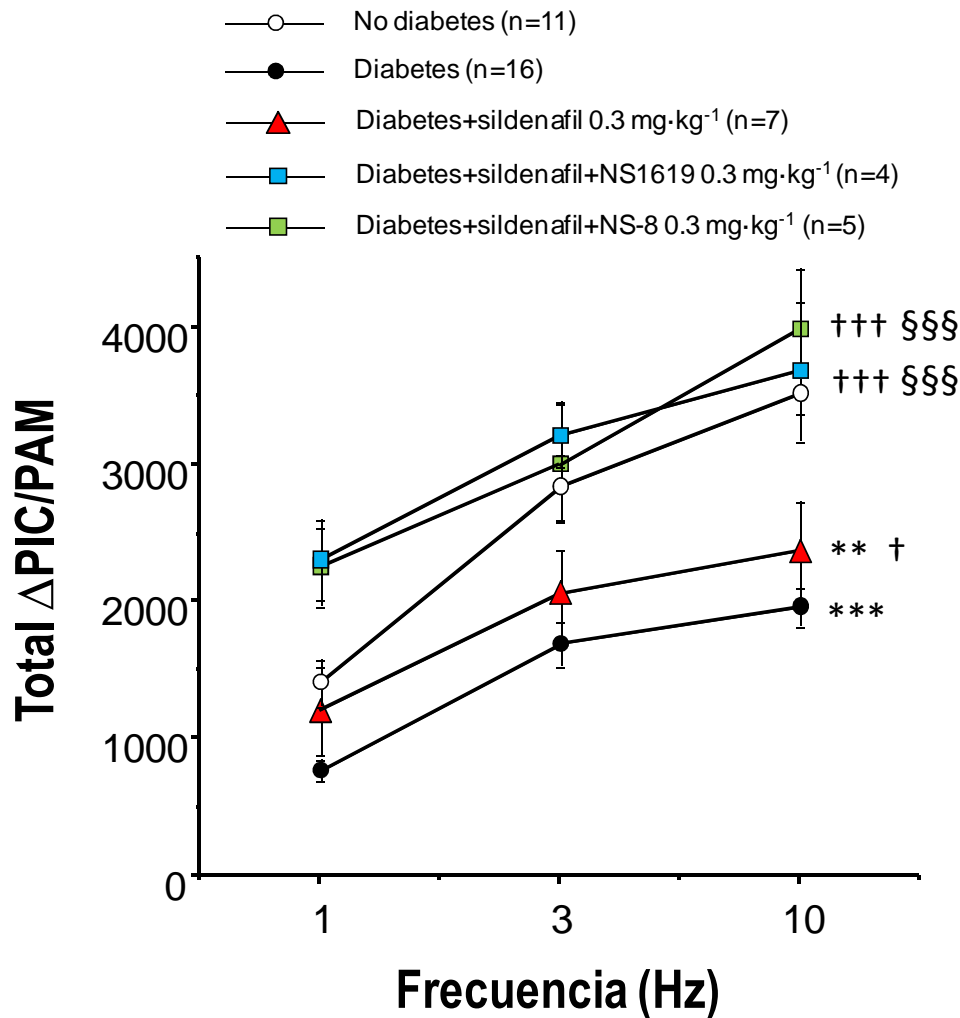


Fig. 43. Efectos de la administración intravenosa del sildenafil (0.3 mg/kg) individualmente o en combinación con los activadores de los K_{Ca}, NS1619 (0.3 mg/kg) ó NS-8 (0.3 mg/kg) sobre las respuestas eréctiles inducidas por la EET del nervio cavernoso en ratas diabéticas anestesiadas. Las respuestas eréctiles de las ratas no diabéticas (No diabetes) se presentan como referencia. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del área bajo la curva (AUC) del incremento de la PIC (Total Δ PIC) normalizado por el valor de la PAM para cada estimulación. n indica el número de animales utilizados en cada experimento. ** p < 0,01, *** p < 0,001 versus No diabetes, † p < 0,05, ††† p < 0,001 versus Diabetes, y §§§ p < 0,001 versus sildenafil por un test ANOVA de dos factores.

Efectos de la modulación de los K_{Ca} sobre la contracción neurogénica de la vejiga humana y de rata

La aplicación de EET causó contracciones neurogénicas dependientes de la frecuencia en tiras de vejiga humana. Dichas respuestas no se modificaron significativamente después del tratamiento con el vehículo (fig. 44A), pero fueron prácticamente abolidas por el bloqueo de la neurotransmisión, con

tetrodotoxina (1 μ M) (fig. 44B), y por un antagonista del receptor muscarínico, atropina (1 μ M) (fig. 44C).

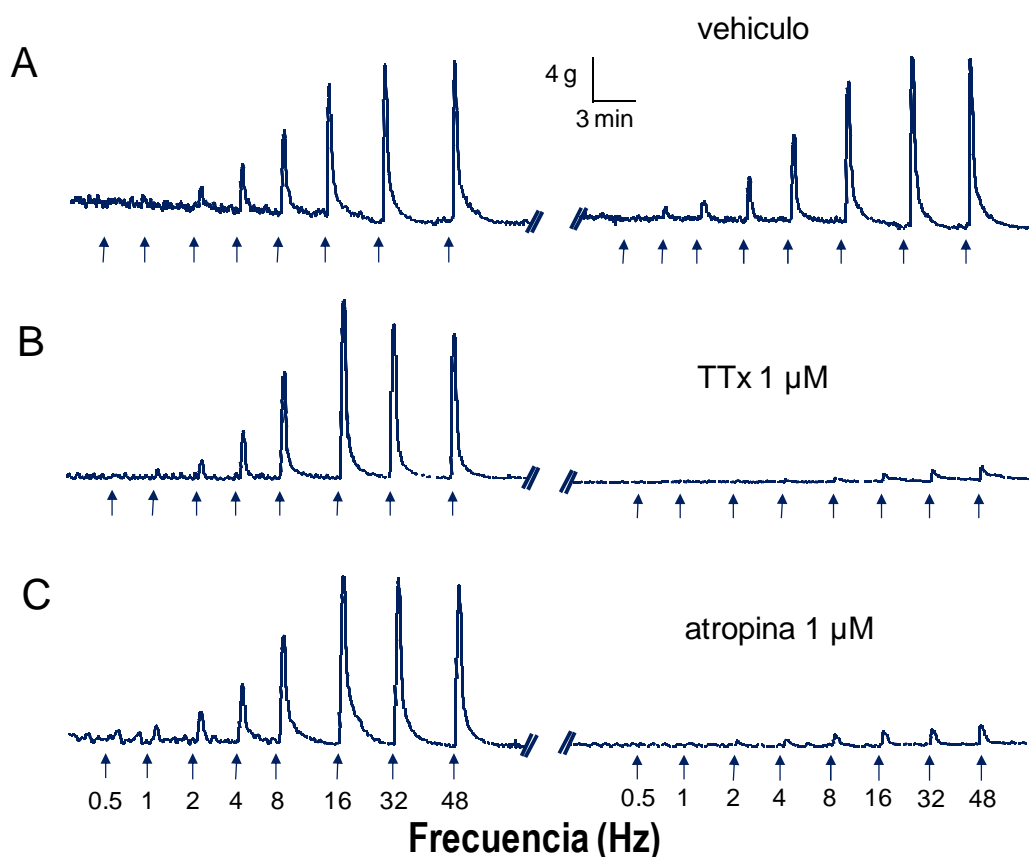


Fig. 44. Trazados representativos de contracciones de tiras de vejiga humana inducidas por estimulación eléctrica (EFT: 0.5-48 Hz) y los efectos sobre estas contracciones del vehículo (0.03% dimetilsulfóxido) (A), la neurotoxina, tetrodotoxina (TTx; 1 μ M) (B), y el antagonista del receptor muscarínico, atropina (1 μ M) (C). La aplicación de EFT está indicada por flechas.

Las contracciones neurogénicas de la vejiga humana no se alteraron significativamente por el bloqueo de los K_{ATP} con glibenclamida (1 μ M) (fig. 45A) o por la inhibición de los IK con TRAM-34 (10 μ M) (fig. 45B) pero fueron significativamente potenciadas por el bloqueo de los BK con iberitoxina (IbTx; 100 nM) (fig. 45C) o los SK con apamina (APA; 100 nM) (fig. 45D).

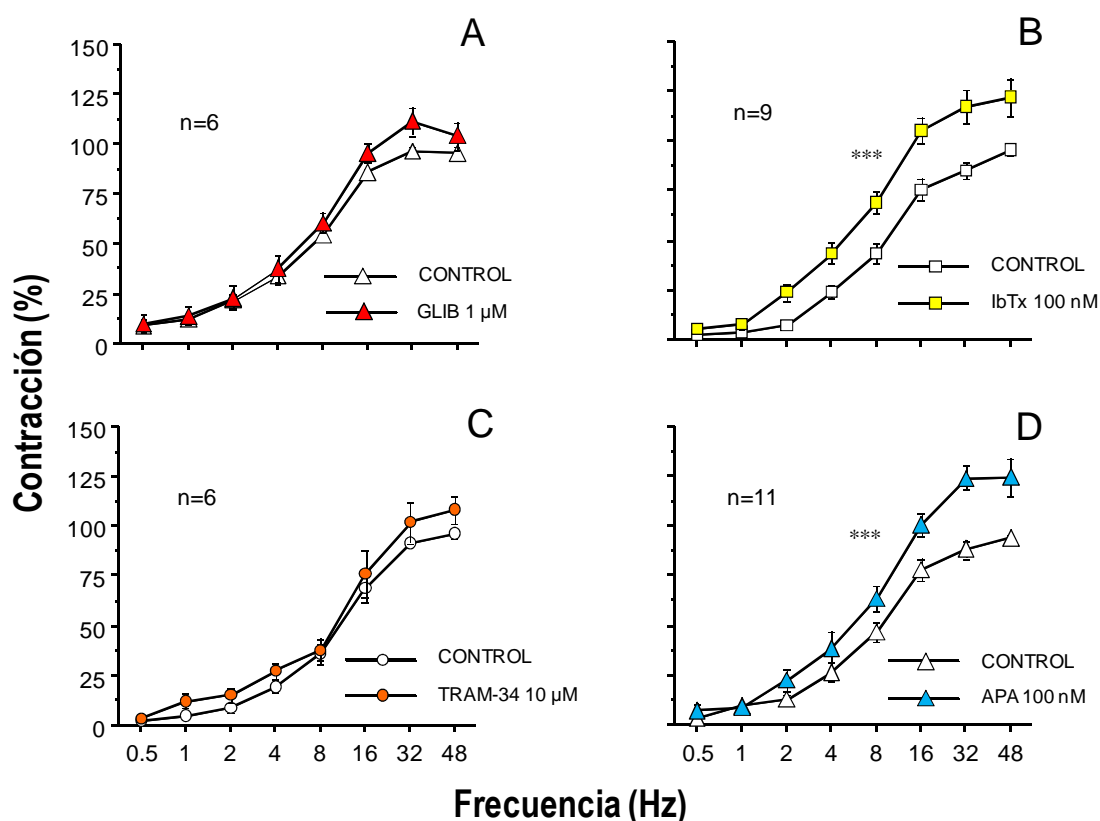


Fig. 45. Efectos del bloqueo de los K_{ATP} , glibenclamida (GLIB, 1 μ M) (A), el bloqueo de los BK, iberiotoxina (IbTx, 100 nM) (B), el bloqueo de los IK, TRAM-34 (10 μ M) (C), y el bloqueo de los SK, apamina (APA, 100 nM) (D) sobre las contracciones inducidas por EET en tiras de vejiga humana. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de máxima contracción inducida por EET en condiciones control. n indica el número de pacientes del que provienen los tejidos empleados en los experimentos. *** indica $p < 0,001$ versus el control por un test ANOVA de dos factores.

Consecuentemente, con el predominio colinérgico en estas respuestas, las contracciones de la vejiga humana inducidas por estimulación eléctrica fueron inhibidas por un agente anticolinérgico, la oxibutinina (0,3 μ M) (fig. 46A). Por otro lado, la estimulación de los canales K_{ATP} con pinacidil (1 y 10 μ M) resultó en una inhibición significativa de las contracciones neurogénicas de la vejiga humana (fig. 46B y 46C). El activador de los IK/SK, NS309, también ocasionó inhibición de las contracciones neurogénicas siendo esta inhibición significativa a 3 y 10 μ M (fig. 46D- 46F).

Resultados

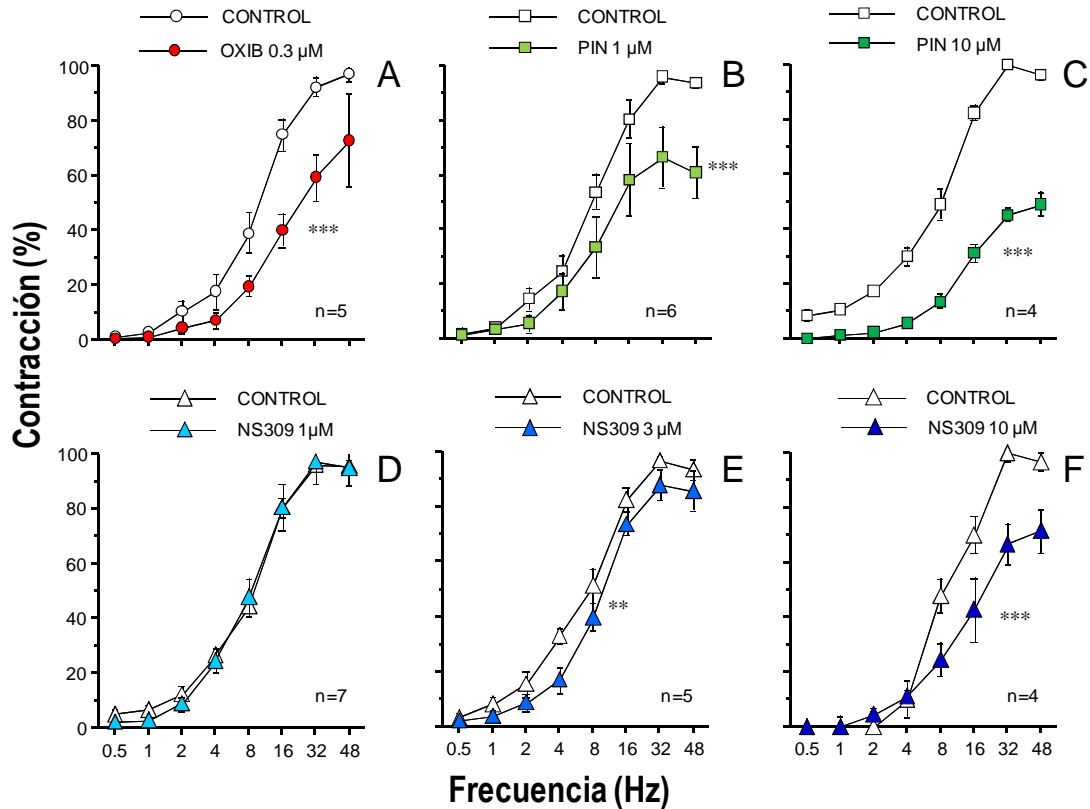


Fig. 46. Efecto de antagonistas de receptores muscarínicos, oxibutinina (OXIB, 0.3 μ M) (A), el activador de los K_{ATP} , pinacidil (PIN), a 1 μ M (B) y 10 μ M (C), y el activador de los IK/SK, NS309, a 1 μ M (D), 3 μ M (E), y 10 μ M (F) sobre contracciones inducidas por la EET (0.5-48 Hz) en tiras de vejiga humana. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la máxima contracción inducida por EET en condiciones control. n indica el número de pacientes del que provienen los tejidos empleados en los experimentos. ** indica $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus el control por un test ANOVA de dos factores.

Estas respuestas también fueron inhibidas por la activación de los BK con NS1619 y NS-8. La inhibición con NS1619 fue significativa a 3 y 10 μ M pero no a una concentración de 1 μ M (fig. 47A-47C). NS-8 produjo una inhibición significativa de las contracciones neurogénicas de vejiga humana a 1, 3 y 10 μ M (fig. 48B-48D) pero no a una concentración más baja, 0,3 μ M (fig. 48A).

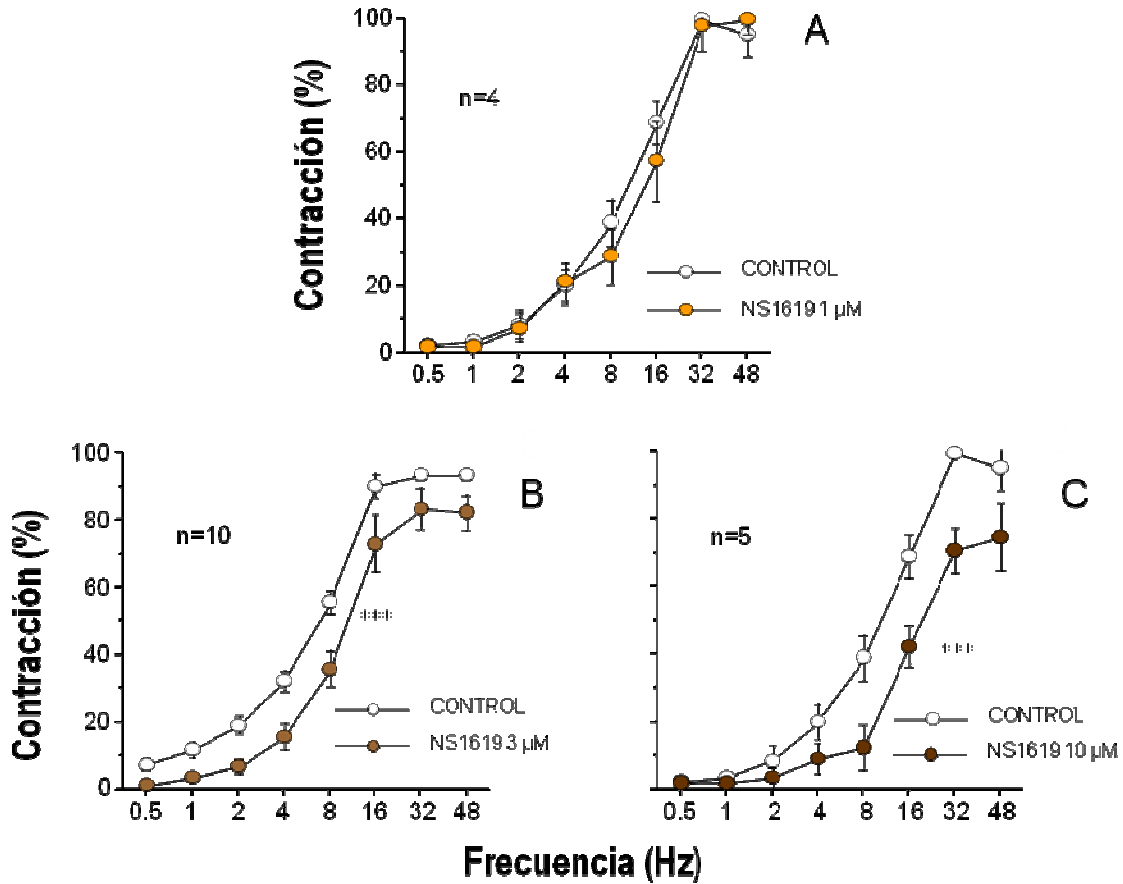


Fig. 47. Efectos del activador de los BK, NS1619, a 1 μ M (A), 3 μ M (B), y 10 μ M (C) sobre las contracciones inducidas por la EET (0.5-48 Hz) en tiras de vejiga humana. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la máxima contracción inducida por EET en condiciones control. n indica el número de pacientes del que provienen los tejidos empleados en los experimentos. * $p < 0,001$ versus el control por un test ANOVA de dos factores.**

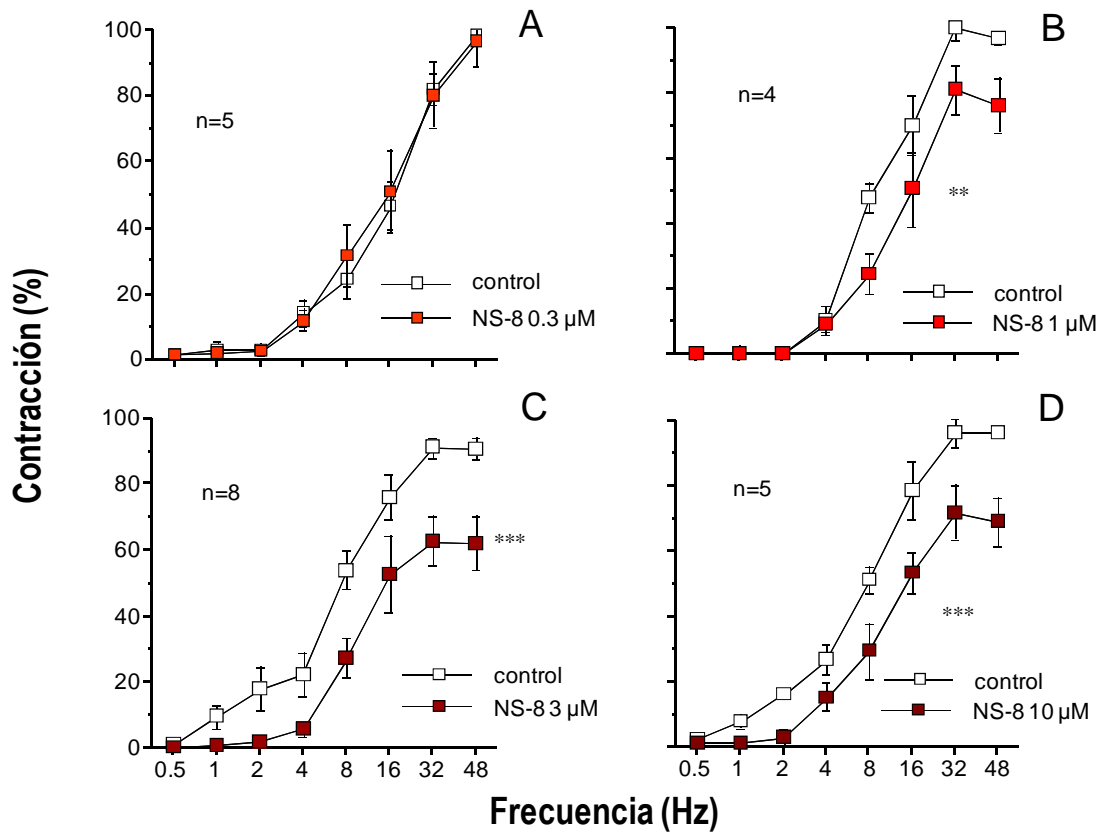


Fig. 48. Efectos del activador de los BK, NS-8, a 0.3 μ M (A), 1 μ M (B), 3 μ M (C), y 10 μ M (D) sobre las contracciones inducidas por la EET (0.5-48 Hz) en tiras de vejiga humana. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la máxima contracción inducida por EET en condiciones control. n indica el número de pacientes del que provienen los tejidos empleados en los experimentos. ** indica $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus el control por un test ANOVA de dos factores.

Influencia de la presencia de síntomas urinarios sobre los efectos de la modulación de los BK sobre las contracciones neurogénicas de la vejiga humana.

Para evaluar los efectos de la modulación de los BK en situaciones patológicas asociadas a síntomas urinarios, se utilizaron especímenes de vejiga procedentes de DO y de pacientes con HBP, y se analizaron separadamente las respuestas en tejidos procedentes de ambas poblaciones de sujetos. La IbTx (100 nM) potenció las contracciones neurogénicas en tejidos procedentes tanto de DO como de pacientes con HBP, aunque la potenciación en vejiga saludable es significativamente mayor, como indica el hecho de que la reducción de la frecuencia requerida para obtener el 50% de contracción (EF_{50}) causada por IbTx es significativamente más marcada en vejigas de DO (Los ratios de EF_{50} fueron $0,49 \pm 0,06$ versus $0,78 \pm 0,10$ en DO y HBP, respectivamente, $p < 0,05$) (fig. 49A y 49B). De una manera similar, la activación de los BK con NS-8 (3 μ M) o con NS1619 (3 μ M) resultó en una

Resultados

inhibición de la contracción neurogénica en vejiga de DO y de pacientes con HBP, pero, en este caso, la estimulación de los BK produjo una inhibición más notable en los tejidos procedentes de pacientes con HBP (fig. 49 C-49F). Así, los incrementos en las EF_{50} causados por el NS-8 y el NS1619 fueron significativamente mayores en especímenes de vejiga procedente de pacientes con HBP (Los ratios de EF_{50} fueron de $1,32 \pm 0,05$ versus $2,86 \pm 0,61$ para NS-8 en DO y HBP, respectivamente, $p < 0,05$; y $1,34 \pm 0,13$ versus $2,38 \pm 0,47$ para NS1619 en DO y HBP, respectivamente, $p < 0,05$).

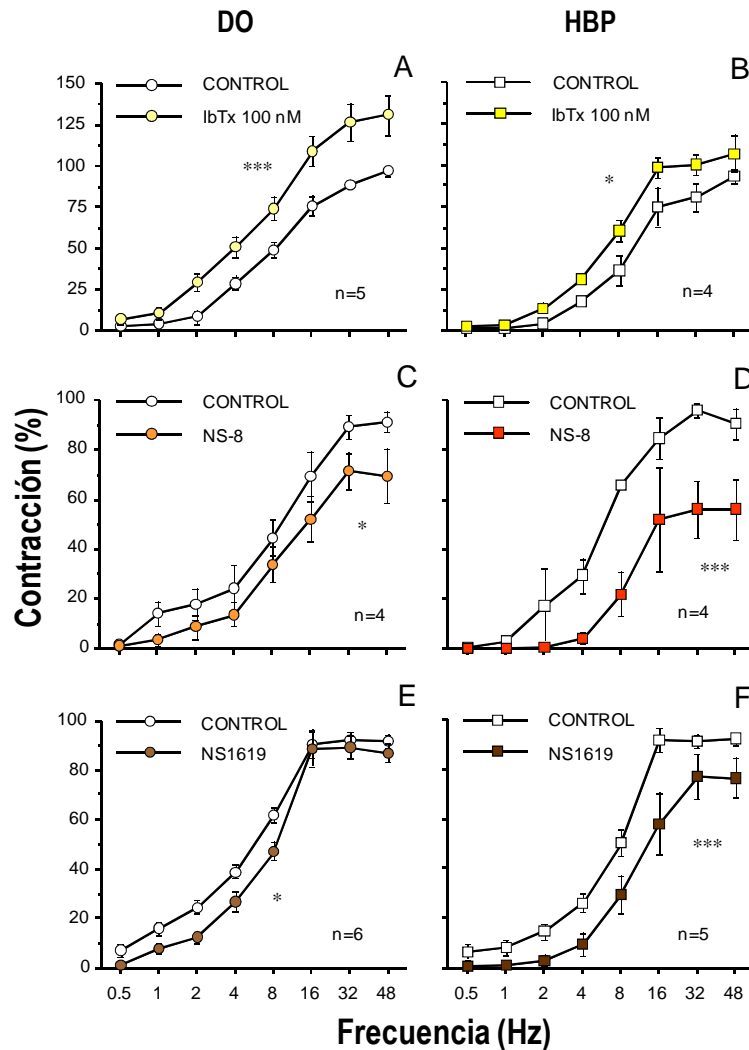


Fig. 49. Efectos del bloqueante de los BK, iberiotoxina (IbTx, 100 nM) (A, B) y los activadores de los BK, NS-8 (3 μ M) (C, D), y NS1619 (3 μ M) (E, F), sobre las contracciones inducidas por la EET, (0.5-48 Hz) en tiras de vejiga humana de DO sin signos urológicos (A, C, E) y de pacientes con hiperplasia benigna de próstata (HBP) (B, D, F). Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la máxima contracción inducida por EET en condiciones control. n indica el número de pacientes del que provienen los tejidos empleados en los experimentos. * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus el control por un test ANOVA de dos factores.

Efectos de la modulación de los K_{Ca} sobre la contracción miogénica de la vejiga humana

La modulación de los canales K_{Ca} específicamente regula las respuestas contráctiles neurogénicas en vejiga humana ya que las contracciones inducidas por el análogo estable de la acetilcolina, carbacol (CCh; 1 nM a 30 μ M) no fueron significativamente modificadas por GLIB (1 μ M) (fig. 50A), IbTx (100 nM) (fig. 50B), TRAM-34 (10 μ M) (fig. 50C) ó APA (100 nM) (fig. 50D) (pD_2/E_{max} para CCh fue de $6,50 \pm 0,05/127,8 \pm 6,0\%$, $6,64 \pm 0,06/114,6 \pm 1,2\%$, $6,52 \pm 0,04/122,1 \pm 15,8\%$ y $6,54 \pm 0,17/109,3 \pm 20,4\%$ para el vehículo, IbTx, TRAM-34 y APA, respectivamente).

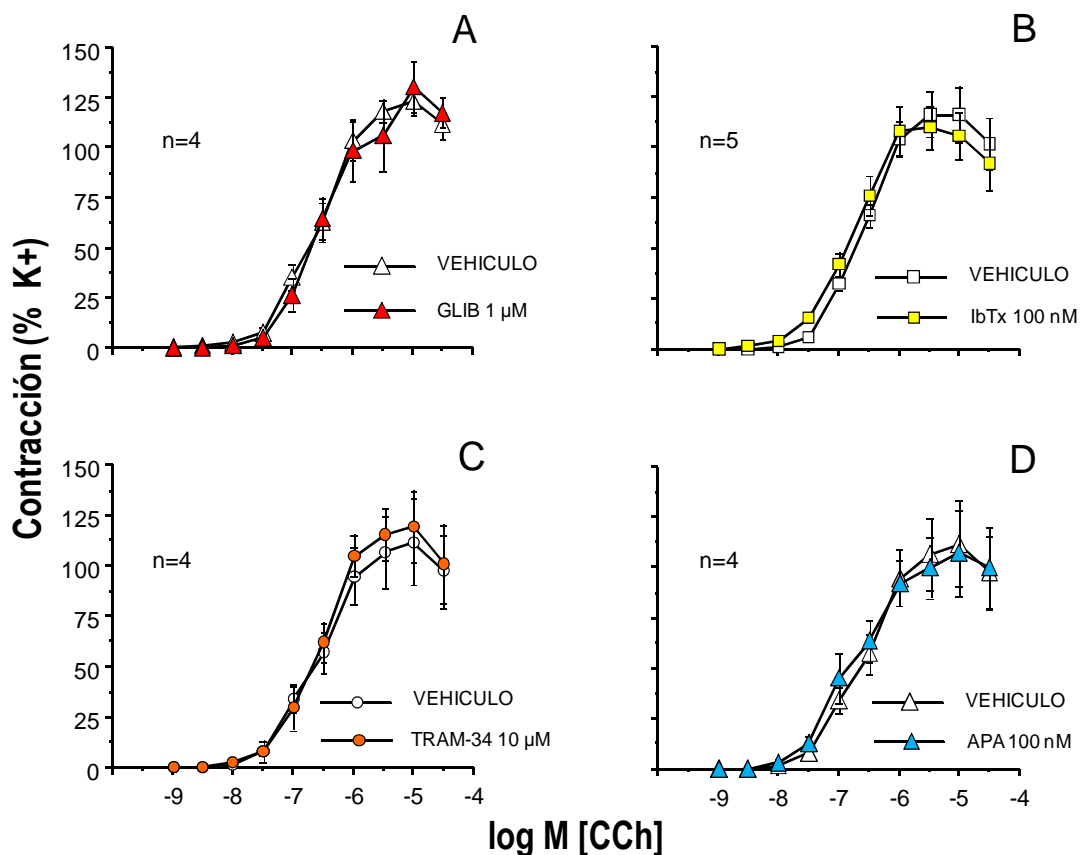


Fig. 50. Efectos del bloqueante de los K_{ATP} , glibenclamida (GLIB, 1 μ M) (A), de los BK, iberitoxina (IbTx, 100 nM) (B), de los IK, TRAM-34 (10 μ M) y de los SK, apamina (APA, 100 nM) sobre las contracciones inducidas por el análogo estable de la ACh, carbacol (CCh) (1 nM a 30 μ M). Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la contracción máxima inducida por 120 mM K^+ . n indica el número de pacientes de los que provienen los tejidos empleados en los experimentos.

Aunque el bloqueo de los K_{ATP} con glibenclamida (1 μ M) no modificó significativamente las contracciones colinérgicas ($6,56 \pm 0,08/115,1 \pm 19,6\%$), la activación de los canales K_{ATP} con pinacidil (1 μ M) causó una inhibición significativa de E_{max} ($6,48 \pm 0,07/93,8 \pm 2\%$, $p < 0,001$ para E_{max}) (fig. 51A). En

este sentido, la activación de los BK con NS-8 (3 μ M) no alteró significativamente las contracciones inducidas por el CCh en vejiga humana ($6,31 \pm 0,11/124,8 \pm 17,2\%$) (fig. 51C). Fue necesaria una concentración de NS-8 diez veces mayor (30 μ M) para observar la inhibición de estas respuestas ($6,09 \pm 0,14/99,6 \pm 7,6\%$ p < 0,05 para E_{max}) (Figura 8 D). Como era de esperar, las contracciones inducidas por CCh fueron antagonizadas por oxibutinina (0.3 μ M) ($5,49 \pm 0,28/129,5 \pm 22,5$, p < 0,01 para pD_2) (fig. 51B).

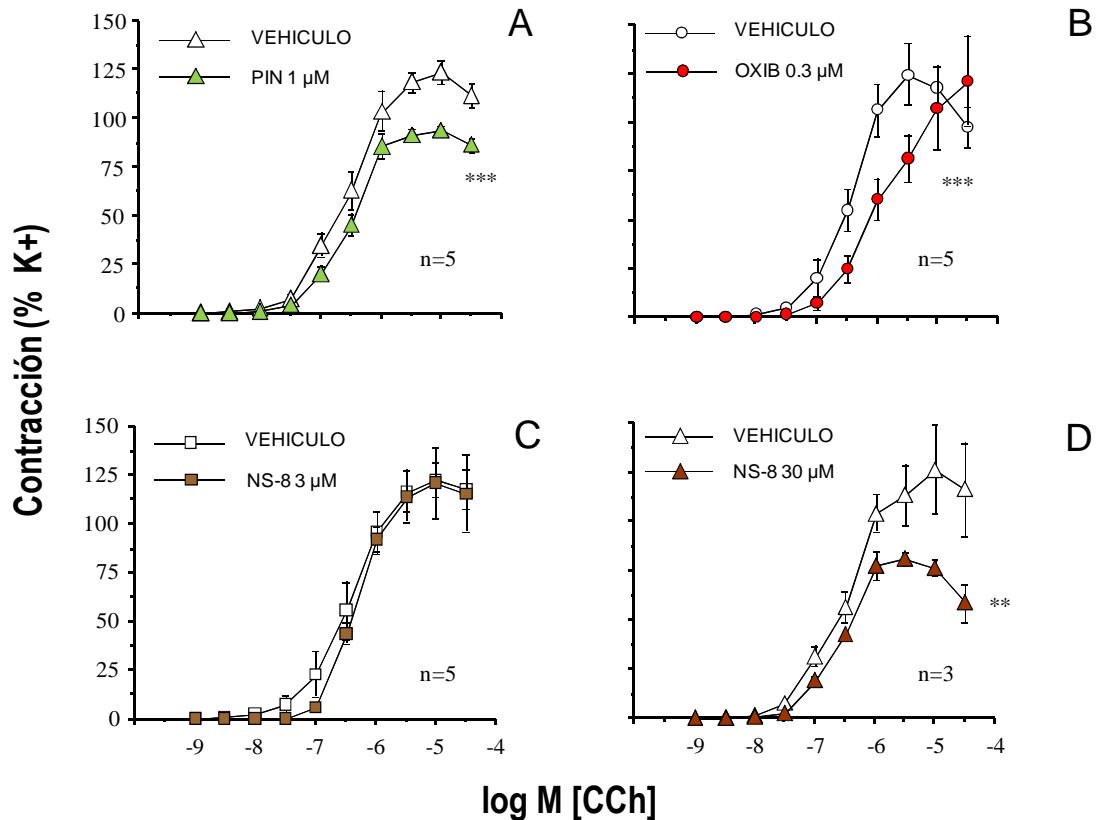


Fig. 51. Efectos del activador de los K_{ATP} , pinacidil (PIN, 1 μ M) (A), del antagonista de receptores muscarínicos, oxibutinina (OXIB, 0.3 μ M) (B) y del activador de los BK, NS-8, 3 μ M (C) y 30 μ M (D) sobre las contracciones inducidas por el análogo estable de la ACh, carbacol (CCh) (1 nM a 30 μ M) en tiras de vejiga humana. Los datos se expresan como la media \pm E.E. del porcentaje de la contracción máxima inducida por 120 mM K^+ . n indica el número de pacientes de los que provienen los tejidos empleados en los experimentos. ** indica p < 0,01, * p < 0,001 versus control por un test ANOVA de dos factores.**

Efectos de la activación de los BK sobre los parámetros cardiovasculares y la función urodinámica en ratas

La administración intravenosa del antagonista de receptores muscarínicos, oxibutinina (1 mg/kg) produjo un efecto hipotensor significativo ($-13,0 \pm 1,7\%$; $p < 0,01$) e incrementó significativamente la frecuencia cardíaca ($17,7 \pm 4,5\%$; $p < 0,05$) en ratas. En condiciones basales, la oxibutinina ($n=4$) no afectó significativamente a la frecuencia de micción ($116,5 \pm 15,3\%$ del control) ni al volumen de micción ($86,8 \pm 12,8\%$ del control), pero disminuyó significativamente el incremento de la presión intravesical observado durante el reflejo de la micción ($75,1 \pm 6,3\%$ del control, $p < 0,05$). De acuerdo con lo previamente descrito en el apartado de la evaluación de las respuestas eréctiles, la administración intravenosa de NS-8 (5 mg/kg) causó una disminución transitoria, no significativa, de la presión arterial media ($-4,6 \pm 2,3\%$; n.s.). Los valores basales de presión arterial se recuperaron en menos de un minuto. La frecuencia cardíaca no se modificó significativamente por la administración de NS-8 ($-2,1 \pm 1,2\%$; n.s.). En condiciones basales, la administración de NS-8 ($n=4$) redujo significativamente la frecuencia de micción ($67,6 \pm 12,3\%$ del control, $p < 0,05$) y aumentó el volumen de micción ($148,9 \pm 20,9\%$ del control, $p < 0,05$). La capacidad contráctil máxima de la vejiga no se modificó tras la administración de NS-8 ($95,0 \pm 2,5\%$ del control; n.s.).

Efectos de la activación de los BK sobre los parámetros urodinámicos en un modelo de vejiga hiperactiva en ratas

La infusión intravesical de ácido acético al 0,3% produjo una hiperactivación de la vejiga en rata, como indicó el incremento de la frecuencia de micción y la reducción del volumen de micción. La capacidad contráctil de la vejiga no se incrementó significativamente en este modelo (fig. 52). En estas condiciones de hiperactividad de la vejiga, en presencia de una infusión intravesical de ácido acético al 0,3%, la administración intravenosa de oxibutinina (1 mg/kg) sólo redujo la frecuencia de micción ligeramente (fig. 53A), no influenció significativamente el volumen de micción (fig. 53B) y causó una reducción significativa de la contractilidad de la vejiga (fig. 53C). Por el contrario, la administración intravenosa de NS-8 (5 mg/kg) mejoró notablemente la función urodinámica en ratas con hiperactividad de la vejiga inducida químicamente. Así, NS-8 disminuyó significativamente la frecuencia de micción (fig. 53D) e incrementó el volumen de micción (fig. 53E) hasta valores no significativamente diferentes de los obtenidos en condiciones control, antes de infundir el ácido acético. Sin embargo, no afectó a la capacidad contráctil de la vejiga (fig. 53F).

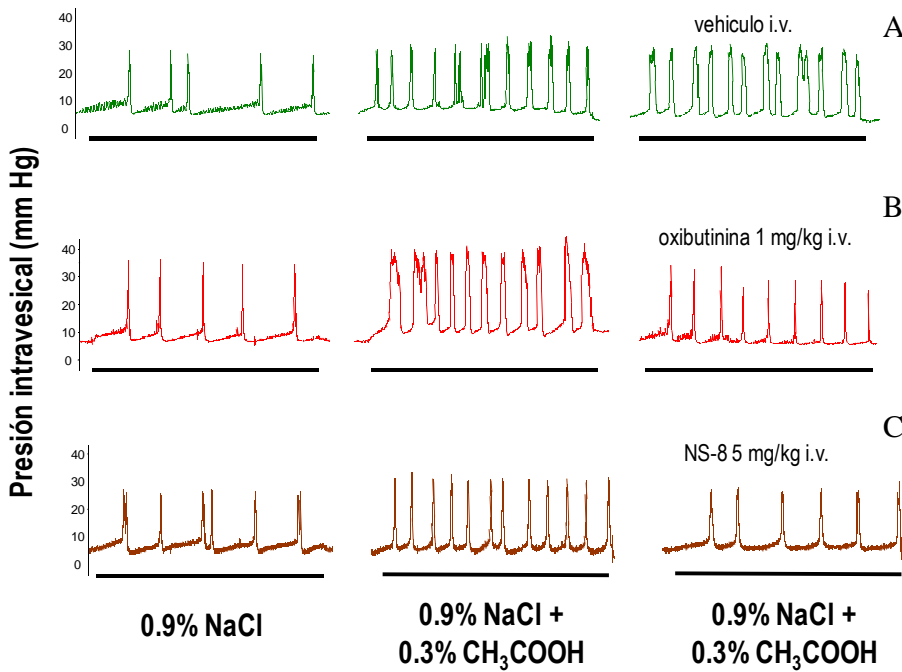


Fig. 52. Trazados de presión intravesical de cistometrías. Se realizaron en ratas anestesiadas durante una infusión intravesical de salino (0.9% NaCl) de 20 min (trazados de la izquierda), seguidamente una infusión de 0,3% ácido acético (CH₃-COOH) en salino (trazados centrales) y, por último, durante una nueva infusión de acético al 0,3%

después de una inyección intravenosa del vehículo (5% DMSO+25% HPβCD en salino) (A), oxibutinina (1 mg/kg) (B) ó NS-8 (5 mg/kg) (C) (trazados de la derecha).

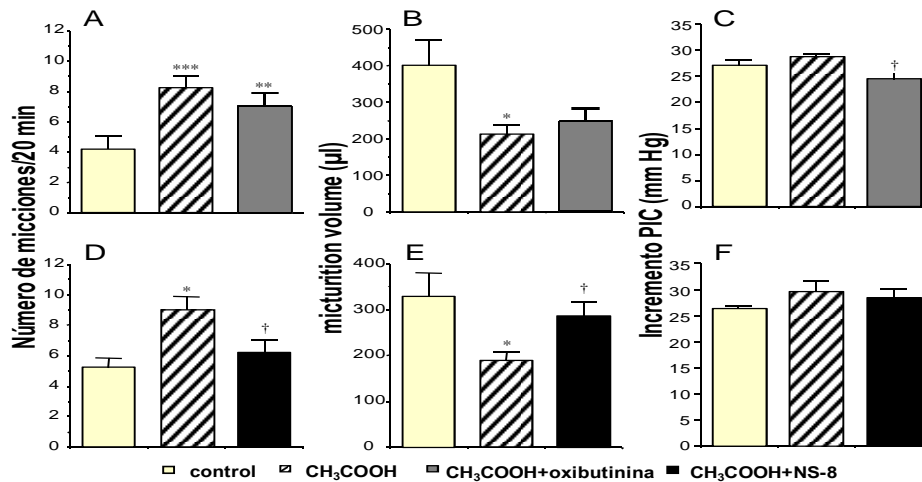


Fig. 53. Los paneles muestran la cuantificación de los efectos de la administración intravenosa de oxibutinina (1 mg/Kg; A-C) y NS-8 (5 mg/Kg; D-F) sobre la alteración de los parámetros urodinámicos causados por la infusión intravesical de 0,3% CH₃-COOH en ratas anestesiadas. La frecuencia de micción (A, D) se muestra como el número de micciones determinadas durante los 20 min de infusión, el volumen de micción (B, E) como el volumen medio en µl obtenido en cada micción y la presión de la vejiga durante las micciones (C, F) como la media del incremento de la presión intravesical (PIV) determinada para cada micción. Los datos se obtuvieron de 5 animales para cada grupo y se expresan como la media ± E.E. * p < 0,05 ** p < 0,01, *** p < 0,001 versus el control y † p < 0,05 versus 0,3% CH₃-COOH por un test ANOVA de un factor seguido de un test de Student-Newmann-Keuls.

Expresión y distribución de los K_{Ca} en la vejiga humana y la vejiga de rata

Los estudios inmunohistoquímicos revelaron en las secciones de vejiga humana, éstas también teñidas con tricrómico de Masson, (fig. 54), una expresión intensa de los BK e IK (fig. 55A y 55B), especialmente en el urotelio.

Los SK estuvieron presentes en el urotelio aunque la expresión de los subtipos SK1 y SK2 fue más intensa (fig. 55C y 55D) que la expresión del subtipo SK3 (fig. 55E).

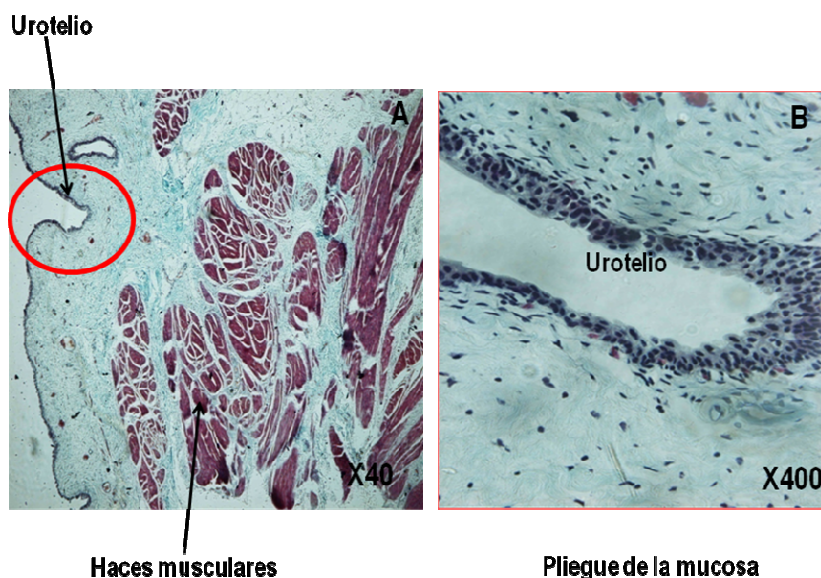


Fig. 54. Corte histológico de una porción de pared de vejiga humana. Imagen de tricrómico de Masson de un corte longitudinal de la pared de la vejiga (A). Panel B aumento (x 400) de la zona señalizada del panel A (x 40).

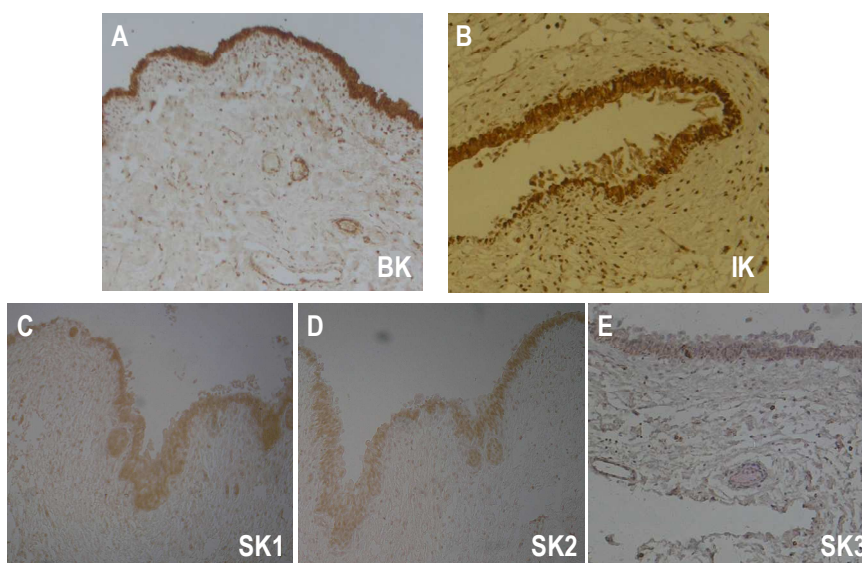


Figura 55. Detección inmunohistoquímica de los subtipos de K_{Ca} en vejiga urinaria humana. La inmunoreactividad aparece en marrón. El aumento original es de x200.

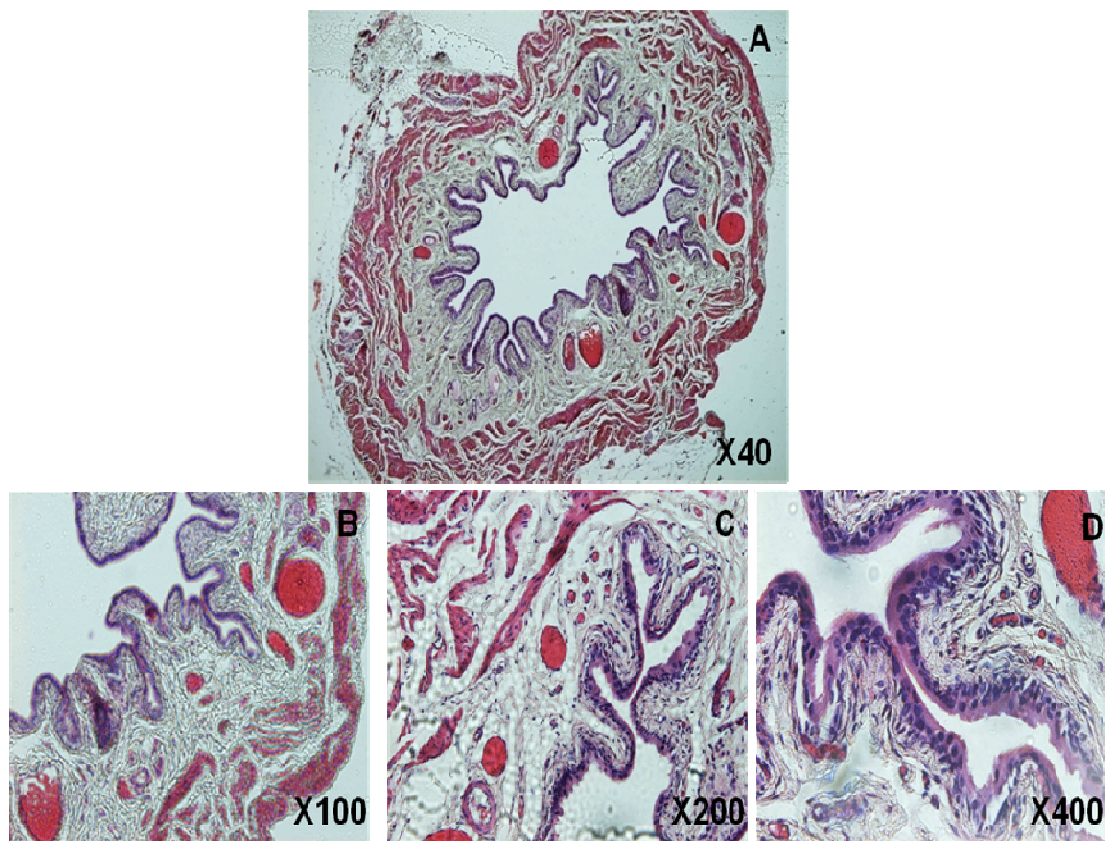


Fig. 56. Cortes histológicos, de hematoxilina-eosina (HE), de vejiga de rata. Imagen de un corte transversal de vejiga (X40) (A) y detalles de diferentes pliegues de la mucosa X100 (B), X200 (C) y X400 (D).

El patrón de expresión de los BK e IK fue igual en la vejiga de rata macho y rata hembra (fig. 57A y 57B), a las cuales observamos sus características morfológicas (fig.56), Entre todos los subtipos de SK, sólo los canales SK1 y SK3 se expresan claramente en el epitelio de vejiga de rata macho (fig. 57C y 57E), mientras SK2 se detecta de una manera más tenue (fig. 57D). El patrón de expresión de los SK en el tejido urinario de rata hembra fue diferente al de la rata macho. Entre todos los tipos de SK, sólo los SK3 se expresan claramente en el urotelio, mientras que los subtipos SK1 y SK2 muestran una débil expresión (fig. 57F y 57G).

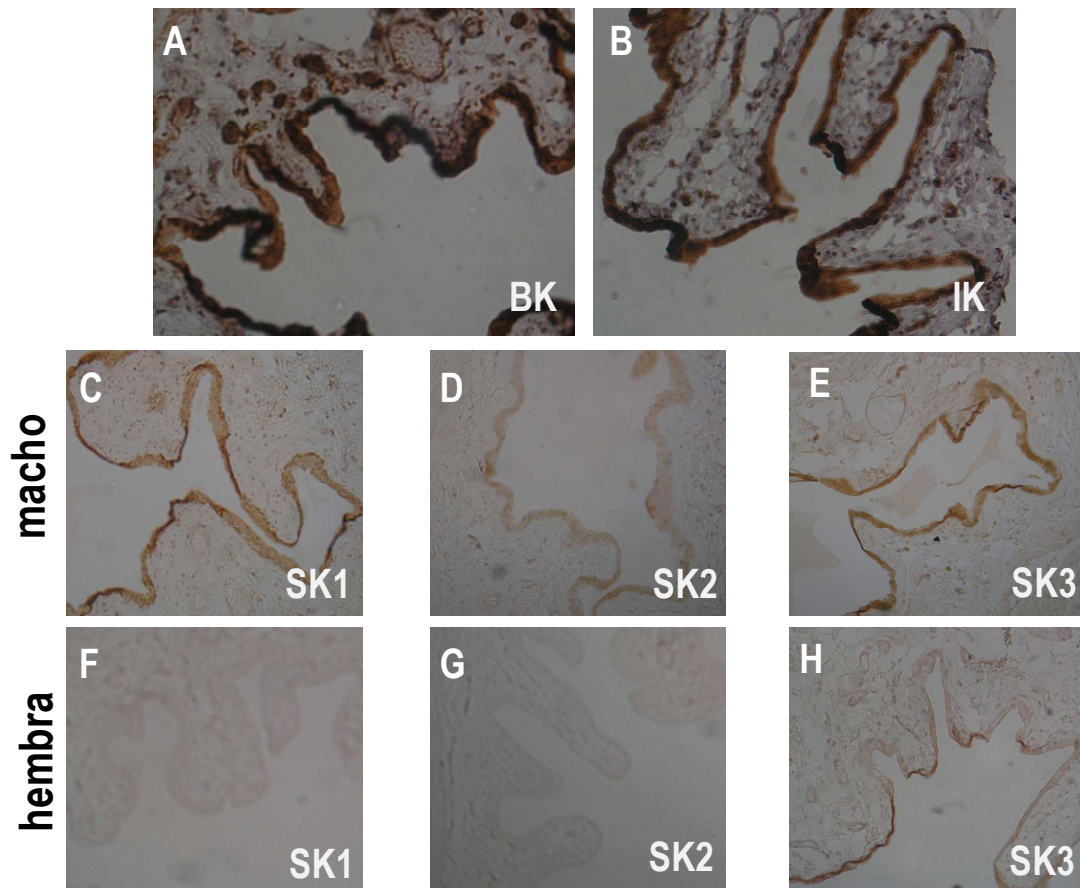


Fig. 57. Detección inmunohistoquímica de los subtipos de K_{Ca} en vejiga urinaria de rata. Como en la vejiga urinaria humana, se detectó una intensa expresión de los canales BK (A) y los IK (B), especialmente en el urotelio. Paneles C, D y E corresponden a secciones de vejiga de rata macho y los paneles F, G y H corresponden a cortes de vejiga urinaria de rata hembra. La inmunoreactividad aparece en marrón. El aumento original es de x200.

- Discusión -

Papel de la activación de los K_{Ca} en la recuperación de la capacidad relajadora de los inhibidores de la PDE5 en la disfunción eréctil diabética

Existen evidencias de las propiedades relajadoras de los activadores de los K_{Ca} en el tejido eréctil humano (Sepktor y col., 2002). Se ha propuesto la activación de los K_{Ca} a través de la vía del NO/GMPc en tejido cavernoso humano (Lee y col., 2001) y de la participación de estos canales en las relajaciones mediadas por el NO en cuerpo cavernoso de conejo (Seftel y col., 1996) y en las arterias de pene de caballo (Simonsen y col., 1995). La capacidad de relajar el CCH ha sido demostrada tanto para activadores clásicos de los K_{Ca} como el NS1619 (Spektor y col., 2002) como para activadores de los K_{Ca} desarrollados con posterioridad, como el NS11021 (Kun y col., 2009). En concordancia con estos hallazgos, en el presente estudio también se observa que los activadores de los K_{Ca} , NS-8 y NS1619, producen la relajación del CCH. Además, se observa que la exposición a los activadores de los K_{Ca} , NS-8 y NS1619, también produce la vasodilatación de las ARPH, un efecto mediado en gran parte por el endotelio. Sin embargo, la magnitud de las relajaciones producidas por NS-8 y NS1619 es moderada, tanto en las ARPH como en el CCH, lo que no apuntaría a un gran potencial terapéutico de estos compuestos para tratar por sí solos la disfunción eréctil.

La PDE5 constituye la mayor actividad hidrolítica del GMPc en las células musculares lisas del tejido eréctil humano. Aunque el mecanismo de acción terapéutico del sildenafil y los otros inhibidores de la PDE5 requiere la liberación de NO neuronal y endotelial, y la activación de la vía NO/GMPc en el músculo liso durante un estímulo sexual, los presentes resultados sugieren que una producción basal de GMPc en el tejido peneano humano es suficiente para causar relajación del músculo liso cuando se acumula por la acción del inhibidor de la PDE5. Coincidentes con las presentes observaciones, trabajos previos han mostrado la capacidad de los inhibidores de la PDE5 para relajar las arterias peneanas de caballo y humanas (Ruiz-Rubio y col., 2004; Angulo y col., 2010a; Martínez-Salamanca y col., 2014) y el CC de conejo y humano (Taher y col., 1997; Kalsi y col., 2004; Martínez-Salamanca y col., 2015). Como era previsible, la respuesta vasodilatadora inducida por el sildenafil en las ARPH fue parcialmente bloqueada por la inhibición de la síntesis de NO o por la inhibición de la guanilato ciclasa soluble, confirmando la implicación de una producción basal de NO/GMPc en la relajación producida por el sildenafil. Sin embargo, el bloqueo de los K_{Ca} también causó una inhibición significativa de las relajaciones inducidas por el sildenafil, sugiriendo que estos canales contribuyen a la actividad relajadora de la inhibición de la PDE5 en estas arterias. La relajación causada por la inhibición de la PDE5 en el CCH también implica un incremento de los niveles de GMPc mediado por el NO, pero esta estructura peneana difiere de las ARPH con respecto a la contribución de los K_{Ca} a la relajación

inducida por la inhibición de la PDE5. La inhibición de las relajaciones al sildenafil tras el bloqueo de los K_{Ca} no se observa en el CCH, lo que sugiere la contribución de los K_{Ca} a la actividad relajadora de la inhibición de la PDE5 en las ARPH pero no en el CCH. Esta divergencia entre las ARPH y el CCH también se ha observado con respecto a la regulación del tono contráctil. Se han descrito diferencias sustanciales entre las ARPH y el CCH en respuesta a fármacos vasoactivos (Hedlund, 1985; Angulo y col., 2002). Además, la relajación dependiente de endotelio atribuida al factor hiperpolarizante del endotelio (EDHF) juega un papel significativo en las arterias peneanas humanas pero no en el cuerpo cavernoso (Angulo y col., 2003a). Este proceso endotelial que implica a los K_{Ca} , y es funcional en las arterias peneanas pero no en el tejido trabecular, es una divergencia funcional que podría estar relacionado con los resultados aquí presentados. La falta de influencia del bloqueo de los K_{Ca} sobre las relajaciones inducidas por la inhibición de la PDE5 en el CCH es, sin embargo, contradictoria con la descrita sensibilidad de la relajación inducida por sildenafil a IbTx en el CCH (Kun y col., 2009).

La presente confirmación de la contribución de los K_{Ca} en la relajación inducida por el inhibidor de la PDE5 en las ARPH, junto con el hecho de que se ha sugerido la implicación de los K_{Ca} en las relajaciones inducidas por la inhibición de la PDE5 en ductus arteriosus de conejo (Thebaud y col., 2002), en el clítoris de conejo (Gragasin y col., 2004) y en arterias de pene de caballo y de rata (Prieto y col., 2006; Sánchez y col., 2008), nos condujo a evaluar en tejido de pene humano el efecto de la activación de los K_{Ca} sobre los efectos de los inhibidores de la PDE5. Los resultados muestran que el tratamiento de las arterias peneanas con dos conocidos activadores de los K_{Ca} , NS-8 y NS1619 (Malysz y col., 2004) potencian las respuestas vasodilatadoras de la inhibición de la PDE5 en las ARPH. Este efecto potenciador no se produce por la interacción farmacológica de dos moléculas específicas ya que ambos activadores producen efectos similares mientras que el NS-8 potencia igualmente las relajaciones inducidas por dos inhibidores distintos de la PDE5, el sildenafil y el tadalafil. La activación de los K_{Ca} por el NS-8 potenció las relajaciones a un análogo estable del GMP_C , el 8-Br- GMP_C , demostrando que la apertura de estos canales modula las respuestas mediadas por el GMP_C en las arterias de pene humano. La idea de una especificidad de las ARPH en la interacción entre la vía NO/ GMP_C y los K_{Ca} , se ve apoyada por la ausencia de efectos significativos del NS-8 y NS-1619 sobre la relajación inducida por el sildenafil en el CCH, incluso a una concentración más alta que en las arterias.

Estudios previos que se han llevado a cabo en diferentes tejidos, incluyendo tejido eréctil, han descrito la activación intracelular de los K_{Ca} por el GMP_C generado en el músculo liso, contribuyendo a la relajación mediada por el NO/ GMP_C (Sausbier y col., 2000; Lee y col., 2001; Gragasin y col., 2004; Tanaka y col., 2004). El mecanismo molecular de esta interacción para la activación de los K_{Ca} de gran conductancia (BK o maxi K) podría estar mediado por la proteína kinasa dependiente de GMP_C (PKG)

(Schubert y col., 2001; Zhou y col., 2001). La existencia de un mecanismo por el que el GMP_C activa a los K_{Ca} no implica que la apertura farmacológica de estos canales potencie necesariamente las respuestas mediadas por el GMP_C. La interacción entre la vía del NO/GMP_C y los K_{Ca} que se describe en el presente estudio puede implicar un proceso independiente de la activación de los K_{Ca} por GMP_C o la PKG. Esta hipótesis está basada, principalmente, en el hecho de que la función endotelial de las arterias peneanas es requerida para observar la potenciación por el NS-8 de la relajación inducida por el sildenafil así como la inhibición de estas respuestas por el bloqueo de los K_{Ca} con CTX y APA, confirmando que este efecto, en las arterias de pene, está mediado por la activación de los K_{Ca} a nivel endotelial.

La falta de efecto del NS-8 sobre la respuesta inducida por el 8-Br-GMP_C en los segmentos arteriales desprovistos de endotelio hace difícil considerar que la desaparición del efecto del NS-8 sobre las respuestas inducidas por el sildenafil en las preparaciones arteriales sin endotelio se debe simplemente a la no participación de la vía del NO/GMP_C en las relajaciones inducidas por el sildenafil bajo estas condiciones. Por lo tanto, una acción directa de los activadores de los K_{Ca} sobre los canales del músculo liso no parece ser responsable de sus efectos potenciadores sobre la relajación a un inhibidor de la PDE5 en las arterias de pene humano. La posible participación de los K_{Ca} endoteliales en este fenómeno estaría en concordancia con un estudio que describe la modulación de las respuestas mediadas por el NO y las contracciones neurogénicas por los K_{Ca} endoteliales en arterias de pene de rata (Kun y col., 2003).

Con respecto a los subtipos específicos de los K_{Ca} responsables de mediar la potenciación inducida por el NS-8 sobre las relajaciones producidas por la inhibición de la PDE5 en ARPH, los BK e IK parecen estar implicados. Esto se infiere del hecho de que el tratamiento individual con IbTx, un bloqueador específico de los BK, así como el TRAM-34, un bloqueador específico de los IK (Wulff y col., 2000), resulta en el bloqueo de los efectos inducidos por el NS-8. Por el contrario, las respuestas relajadoras a sildenafil en las ARPH se potencian a pesar de la presencia del bloqueador de los SK, apamina. El NS-8 y el NS1619 son moléculas descritas como activadores de los BK (Malysz y col., 2004). En ensayos *in vitro*, se ha visto que la EC₅₀ para la activación de la salida de iones K⁺ está entre 1 y 4 μM para NS1619 y NS-8 (Parihar y col., 2003b). La mayoría de los datos que informan sobre la especificidad de estas moléculas han sido generados en estudios funcionales donde una dependencia de la activación de los BK en los efectos inducidos por el NS-8 ó NS1619 es abolido por las toxinas selectivas de los BK (Holland y col., 1996; Malysz y col., 2004; Soder y col., 2001). Aunque el NS-8 es un activador conocido de los BK (Parihar y col., 2003b; Malysz y col., 2004), NS1619 es considerado por algunos autores como el único activador selectivo de los BK (Ghatta y col., 2006) sin ningún efecto sobre los K_{ATP}, K_V, canales Na⁺ o Ca²⁺ (Olsen y col., 1994). De acuerdo con resultados previamente

publicados (Parihar y col., 2003b; Malysz y col., 2004), no hay diferencias cualitativas entre los efectos inducidos por NS1619 y NS-8 en nuestros parámetros experimentales, sugiriendo que las diferencias en selectividad entre estas moléculas no existe o no son relevantes para los presentes hallazgos. Por otro lado, algunos autores sugieren que existe la posibilidad de la activación simultánea de los IK (Shie y col., 2000; Nardi y col., 2008). Sin embargo, en ensayos funcionales *in vitro*, la ausencia de efecto del NS-8 sobre la actividad de los IK se ha demostrado (Parihar y col., 2003a). De la misma manera, se ha demostrado que el NS1619 no activa los IK en las células endoteliales de la aorta de bovino, incluso inhibió a este canal a altas concentraciones en experimentos electrofisiológicos (Cai y col., 1998). Aunque la activación de los IK por el NS-8 debido a la falta de especificidad de este activador no puede ser completamente descartada, una posible explicación para este mecanismo complejo podría depender de una activación secuencial de IK después de la activación de BK por NS-8 en el mismo o en diferente tipo celular, eso sería consistente con el hecho de que el bloqueo individual de BK ó IK resulta en una pérdida completa del efecto inducido por NS-8. Los resultados obtenidos en preparaciones vasculares (Climent y col., 2012) apuntarían a la participación de los BK del músculo liso y los IK de las células endoteliales en los efectos inducidos por la activación de los K_{Ca}.

La contribución requerida del endotelio en los efectos causados por el NS-8 sugiere que al menos uno de estos canales debe expresarse en el endotelio de las ARPH. El presente trabajo aporta la evidencia de que estos dos canales se expresan en las células endoteliales de las ARPH, como demuestra la inmunodetección de los BK e IK en las arterias de los especímenes de cuerpo cavernoso humano. Utilizando el mismo anticuerpo para la detección del IK, el Dr. Chen y sus colaboradores (Chen y col., 2004) no detectaron la expresión del IK en el CCH, pero no aportaron información sobre la expresión de los IK en las ARPH de sus especímenes. De hecho, la expresión de los IK se ha detectado en las células endoteliales de diferentes lechos vasculares humanos (Kholer y col., 2000; Brakemeier y col., 2003; Grgic y col., 2005). Los datos relativos a la presencia de los BK en el endotelio vascular son controvertidos. Se ha publicado que no se expresan en las células endoteliales coronarias bovinas (Gauthier y col., 2002) y sólo se expresan en el endotelio de las arterias mesentéricas humanas en condiciones patológicas (Kholer y col., 2000). Por otro lado, la expresión de los BK se ha observado en las células endoteliales de aorta bovina (Wang y col., 2005) y en las células endoteliales de microvasos de la dermis (Grgic y col., 2005). Nuestros resultados confirman los estudios donde se encuentra la expresión de los BK en el endotelio vascular. Curiosamente, el endotelio de los espacios lacunares y el músculo liso circundante del tejido trabecular también expresa los BK, IK y SK. De hecho, se observa una intensa expresión de los IK en las muestras de CCH estudiadas a pesar de utilizar el anticuerpo que nos proporcionó el Dr. Chen y colaboradores, quienes no encontraron la expresión de los IK en CCH (Chen y col., 2004). Así, parece que la ausencia de los efectos de los activadores sobre la vía del

NO/GMP_C en el CCH se debe a una diferencia funcional más que a la ausencia de algunos de los canales implicados.

Como demuestran los estudios inmunohistoquímicos, al igual que en las ARPH, los K_{Ca} también se expresan en el endotelio de las arterias peneanas de rata, proporcionando la base estructural para considerar la rata un modelo aceptable para la evaluación de las posibles acciones de los activadores de los K_{Ca} en las respuestas eréctiles. Por otro lado, la expresión de los K_{Ca} en el cuerpo cavernoso de la rata es muy diferente de la del CCH, ya que sólo los BK se detectan en este tejido con claridad.

Para averiguar si el incremento de la capacidad relajadora de los inhibidores de la PDE5 por la activación de los K_{Ca} en las arterias peneanas se correspondía con un impacto sobre la función eréctil, llevamos a cabo la evaluación de la combinación de la inhibición de la PDE5 y la activación de los K_{Ca} sobre las respuestas eréctiles en un modelo de rata *in vivo*. Aunque a concentraciones relativamente elevadas, tanto la administración sistémica (i.v.) de un activador de los K_{Ca} como de un inhibidor de la PDE5 produjeron un aumento de las respuestas eréctiles en ratas sanas. El efecto potenciador del NS-8 sobre las respuestas eréctiles coincide con un estudio que muestra una modulación positiva de las respuestas eréctiles en ratas por la estimulación de los BK con el activador NS11021 (Kun y col., 2009). Sin embargo, a dosis que no afectan individualmente las respuestas eréctiles, la administración de la combinación del NS-8 y el sildenafil causó una potenciación significativa de estas respuestas en las ratas, hasta alcanzar unos niveles similares a los producidos por una dosis alta del inhibidor de la PDE5. Por tanto, la administración sistémica de un activador de los K_{Ca} potenció los efectos de la inhibición de la PDE5 sobre la función eréctil en ratas, sugiriendo que la activación de los K_{Ca} mejora la vasodilatación *in vivo* de las arterias peneanas inducida por la vía del NO/GMP_C. Es importante destacar, que este efecto potenciador fue alcanzado a una dosis del activador de K_{Ca} que no impactó significativamente la presión arterial, una característica que representa una ventaja sobre la activación de los K_{ATP}.

Esta observación del incremento de la actividad vasodilatadora y pro-eréctil de la inhibición de la PDE5 tras la estimulación farmacológica de los K_{Ca} podría tener una especial relevancia clínica para los pacientes que son refractarios al tratamiento estándar con los inhibidores de la PDE5. Una de estas condiciones es la DE diabética. Aunque la DE está asociada con una reducción de la capacidad relajadora del tejido eréctil humano, este deterioro es especialmente severo en el tejido eréctil de pacientes diabéticos como aquí se muestra. En este sentido, la relajación dependiente de endotelio en tejido eréctil humano de pacientes con DE está deteriorada. Sin embargo, cuando se considera la existencia de diabetes entre los pacientes con DE, la presencia de este factor de riesgo se asocia a un mayor deterioro de la relajación dependiente de endotelio del CCH y de las ARPH. Esto significa que aunque la función endotelial está significativamente reducida en pacientes con DE sin diabetes, los

tejidos de los pacientes con DE diabética presentan un grado de disfunción endotelial significativamente más severo. La función eréctil está estrechamente relacionada con la función endotelial. De hecho, la función endotelial coronaria, se ha correlacionado con la capacidad eréctil en pacientes con aterosclerosis (Elesber y col., 2006) y, en los pacientes diabéticos, la disfunción endotelial sistémica está asociada con la DE (De Angelis y col., 2001; Pegge y col., 2006).

La prevalencia de la DE se incrementa con la edad (Feldman y col., 1994; Martín-Morales y col., 2001). Una edad similar de los pacientes diabéticos y de los pacientes no diabéticos excluye un efecto confuso de la edad entre estos grupos de pacientes con DE. Aunque la edad de los donantes de órganos fue significativamente más baja que la de los pacientes con DE, el impacto de la diabetes y la DE sobre la respuesta endotelial del tejido eréctil humano no se debe a un efecto relacionado con la edad. El daño endotelial de los tejidos de los pacientes con DE con y sin diabetes se observa cuando se consideraron los tejidos de los DO mayores de 50 años (con una edad similar que la de los pacientes con DE). De hecho, la relajación endotelial de los tejidos de DO de más edad y de los más jóvenes fue muy parecida. Por lo tanto, el impacto de la diabetes sobre la relajación endotelial del tejido eréctil vascular y trabecular en humanos es claramente más pronunciado que el producido por la edad. Este hecho podría explicar la baja respuesta de los pacientes diabéticos a las terapias convencionales para el tratamiento de la DE (Rendell y col., 1999; Sáenz de Tejada y col., 2002; Goldstein y col., 2003).

Además del endotelio, la inervación nitrérgica del cuerpo cavernoso y de las arterias peneanas es responsable del inicio de la relajación del músculo liso y de la vasodilatación que culmina en la erección peneana. La EET de las tiras de CCH y de las ARPH en presencia de guanetidina y atropina (previenen la neurotransmisión adrenérgica y la estimulación colinérgica, respectivamente) resulta en una relajación neurogénica dependiente de la frecuencia de naturaleza nitrérgica como demuestra su completa desaparición tras la inhibición de la NOS. Como se muestra en este trabajo, la relajación nitrérgica del músculo liso peneano está disminuida en tejidos procedentes de pacientes con DE y aún más reducida en pacientes diabéticos con DE. Estudios previos han publicado una reducida relajación neurogénica del CCH de pacientes diabéticos con DE (Saenz de Tejada y col., 1989) y de pacientes con DE vascular (Pickard y col., 1994). Lo que se añade en este trabajo es que el deterioro de la relajación neurogénica del tejido cavernoso de pacientes diabéticos con DE es más acusada que la que existe en los pacientes no diabéticos con DE y que esta característica es compartida por otra estructura fundamental de la función eréctil, las ARPH.

Como se ha mencionado anteriormente, el NO juega un papel fundamental en la relajación del músculo liso peneano (Kim y col., 1991; Rajfer y col., 1992) y en la erección peneana (Burtnett y col., 1992; Trigo-Rocha y col., 1993). Aunque en las ARPH el EDHF contribuye a la vasodilatación dependiente de

endotelio (Angulo y col., 2003a), el NO es un mediador clave en la relajación endotelial y neurogénica del CCH y de las ARPH. En este sentido, una alteración en la vía del NO/GMP_c puede reducir la capacidad relajadora del tejido eréctil y dificultar la erección peneana. De hecho, se observa una disminución en el contenido del GMP_c en el tejido cavernoso de pacientes con DE. Esto sugiere que una generación basal de NO/GMP_c es defectuosa en el tejido de pacientes con DE ya que la reducción ocurre en ausencia de una estimulación externa. Además, la capacidad del CCH para generar GMP_c tras la estimulación con ACh se reduce en pacientes con DE. Sin embargo, la reducción de los niveles de GMP_c, tanto en basal como tras la estimulación con ACh, está particularmente acentuada en los tejidos de los pacientes diabéticos con DE, sugiriendo que existe un deterioro severo de la vía del NO/GMP_c en el tejido eréctil de pacientes diabéticos con DE. Este hecho podría ser responsable del déficit en la relajación mediada por NO en CCH y ARPH de pacientes diabéticos que a su vez podría explicar la elevada prevalencia de DE entre la población diabética. Sin embargo, ya que las respuestas mediadas por un donador de NO no se vieron afectadas por la DE o por la diabetes en el CCH y en las ARPH, parece que la alteración de la vía del NO/GMP_c podría deberse a una producción defectuosa o a una reducida disponibilidad del NO más que a una disminuida sensibilidad al NO a nivel del músculo liso. Además la severidad del impacto de la diabetes sobre la vía del NO/GMP_c podría estar relacionada con la mermada respuesta terapéutica de los inhibidores de la PDE5, la primera línea terapéutica para el tratamiento de la DE, en los pacientes diabéticos (Vickers y col., 2002; El-Sakka y col., 2004). Los inhibidores de la PDE5 amplifican la relajación mediada por el NO previniendo la hidrólisis del GMP_c, pero, si el aporte de GMP_c es excesivamente reducido, la inhibición de la PDE5 no podría alcanzar la potenciación necesaria de la relajación mediada por el NO, limitando la recuperación de la función eréctil. En este sentido, la relajación producida por el inhibidor de la PDE5, sildenafil, se reduce en el tejido eréctil de los pacientes con DE. Este efecto se observa en el CCH y está especialmente pronunciado en las ARPH. Una observación también confirmada para los otros inhibidores de la PDE5, tadalafil y vardenafil (Martínez-Salamanca y col., 2014). Además, cabe señalar que las diferencias más notables en las relajaciones inducidas por el inhibidor de la PDE5 se observan a bajas concentraciones de sildenafil, que son las clínicamente relevantes considerando las concentraciones plasmáticas de los inhibidores de la PDE5 alcanzadas tras la administración oral (Muirhead y col., 2002; Burnett y col., 2009; Papoutsis y col., 2011). Esto refuerza la idea de que la producción basal de NO/GMP_c se reduce drásticamente en el tejido eréctil de los pacientes diabéticos. La baja disponibilidad de GMP_c, además, podría limitar la actividad farmacológica de los inhibidores de la PDE5, ya que la enzima PDE5 posee sitios de regulación alostérica para el GMP_c que incrementa notablemente la afinidad de los inhibidores de la PDE5 para la enzima (Corbin y col., 2003; Blount y col., 2004). De acuerdo con esta observación, el sildenafil se ha demostrado que recupera la

relajación endotelial del CCH de pacientes diabéticos mientras que no es capaz de revertir la disfunción endotelial de las ARPH, probablemente debido a que existe un deterioro en la hiperpolarización dependiente de endotelio inducido por la diabetes, además de la reducción de las respuestas mediadas por la vía del NO/GMP_C (Angulo y col., 2003b). Dado que la vasodilatación de las ARPH es tan importante como la relajación del CCH para la función eréctil, una falta de efecto sobre las ARPH podría dar lugar a una reducida eficacia del tratamiento. Por lo tanto, unos niveles bajos de NO/GMP_C podrían contribuir a una reducida eficacia de los inhibidores de la PDE5 para el tratamiento de la DE en los pacientes diabéticos. De hecho, la reversión de la DE inducida por la diabetes en ratas obtenida sólo cuando se potencian conjuntamente la vía del NO/GMP_C con sildenafil y la hiperpolarización dependiente de endotelio con dobesilato (Angulo y col., 2005), remarca la preservación de la función arterial peneana como diana para el tratamiento de la DE.

En este sentido, aquí se demuestra que la activación de los K_{Ca} con NS-8 potencia las repuestas relajadoras de la inhibición de la PDE5 en las ARPH de pacientes diabéticos y pacientes no diabéticos. Además, este efecto potenciador posibilita que las vasodilataciones inducidas por el sildenafil en ARPH de pacientes diabéticos y no diabéticos, que eran significativamente diferentes en condiciones basales, sean comparables tras el tratamiento con NS-8, recuperándose la eficacia de la inhibición de la PDE5 en las ARPH de pacientes diabéticos.

De nuevo, se pretendió corroborar *in vivo* esta mejora de la eficacia demostrada *in vitro*. La diabetes causó una reducción de las respuestas eréctiles en las ratas que no pudo ser completamente revertida por el tratamiento individual con el sildenafil, de forma similar a lo previamente observado (Bivalaqua y col., 2004; Angulo y col., 2005; Zhang y col., 2006). De manera similar, el tratamiento con los activadores de los K_{Ca} no logró revertir la DE por sí mismo en los animales diabéticos, aunque el NS-8, a una dosis de 5mg/kg mejoró las respuestas eréctiles. Sin embargo, la combinación de la inhibición de la PDE5 y la activación de los K_{Ca} revirtió completamente la disfunción eréctil en las ratas diabéticas. Interesantemente, esto se observó con el NS-8 así como con el otro activador de los K_{Ca}, NS1619. Por lo tanto, la activación de los K_{Ca} facilita la recuperación de la función eréctil promovida por el sildenafil en un modelo de DE. Esta observación alcanza más relevancia clínica por el hecho de que se produce en un modelo de diabetes. Por tanto, el incremento de la eficacia de los inhibidores de la PDE5 mediante la co-administración de activadores de los K_{Ca} puede constituir una estrategia terapéutica razonable en el tratamiento de la disfunción eréctil en la diabetes. Además, los activadores de los K_{Ca} podrían tener una ventaja con respecto a los activadores de los K_{ATP} que es la falta de un efecto importante sobre la presión sanguínea.

En definitiva, la activación de los K_{Ca} potencia los efectos de los inhibidores de la PDE5, en arterias de pene humano, un efecto que es dependiente de endotelio. Este efecto potenciador de los abridores de

los K_{Ca} es específico para las ARPH y no para el CCH, pero causa un aumento de la eficacia de la inhibición de la PDE5 sobre la función eréctil. De hecho, la activación de los K_{Ca} facilita la recuperación de la función eréctil por la administración de un inhibidor de la PDE5 en un modelo de disfunción eréctil en diabetes. La administración de los abridores de los K_{Ca} como estrategia para mejorar la eficacia de los inhibidores de la PDE5 podría representar un beneficio terapéutico en el tratamiento de la disfunción eréctil, principalmente en aquellos grupos de pacientes que son refractarios al tratamiento convencional, como es el caso de los pacientes diabéticos.

Papel de la activación de los canales BK en el alivio de la hiperactividad vesical/LUTS

Además de su influencia sobre la función eréctil discutida anteriormente, se ha sugerido la activación de los canales de K^+ como diana terapéutica para el tratamiento de la hiperactividad vesical (Anderson y col., 2004a; Petkov y col., 2001b).

La estimulación eléctrica de las tiras de vejiga humana produce contracciones neurogénicas. La naturaleza neurogénica de estas respuestas se demuestra con la práctica abolición de toda respuesta contráctil a la estimulación eléctrica en las tiras de vejiga humana expuestas a TTX. Además, las contracciones neurogénicas están principalmente mediadas por la liberación de ACh y la activación de los receptores muscarínicos en las células musculares, ya que las respuestas contráctiles son prácticamente abolidas al bloquear los receptores muscarínicos con atropina. Esto es consistente con estudios previos en los que se muestra el papel secundario para el sistema purinérgico en la mediación de la contracción neurogénica del músculo detrusor humano, el cual sólo es significativo en determinadas condiciones fisiopatológicas (Bayliss y col., 1999).

A pesar de la falta de efecto del bloqueo de los K_{ATP} con glibenclamida sobre las contracciones neurogénicas o miogénicas de la vejiga humana, la activación de estos canales con pinacidil resultó en una inhibición de las respuestas neurogénicas así como de las respuestas miogénicas. Se ha demostrado previamente que el pinacidil inhibe la contracción miogénica de la vejiga humana (Darblade y col., 2006). De hecho, se ha observado en modelos animales, que activadores de canales que actúan específicamente sobre los K_{ATP} (Bonev y col., 1993) son muy eficaces en el tratamiento de la vejiga hiperactiva (Andersson y col., 1988; Igawa y col., 1992; Howe y col., 1995; Petkov y col., 2001). No obstante, aunque esta clase de agentes terapéuticos tienen beneficios potenciales en el tratamiento de la incontinencia urinaria de urgencia y en la vejiga hiperactiva, la clave está en poder separar los efectos sobre el tracto urinario de los efectos cardiovasculares que puedan producir (Moreland y col., 2004). Se han desarrollado nuevos activadores de los K_{ATP} que presentan cierta selectividad urológica

(Brune y col., 2002; Gopalakrishnan y col., 2002; Hewawasam y col., 2002), aunque no están libres de ejercer efectos sobre la presión sanguínea cuando se han evaluado *in vivo* en un modelo animal (Fabiya y col., 2003).

Las contracciones de la vejiga humana inducidas por la estimulación eléctrica están funcionalmente reguladas por la actividad de los K_{Ca} . Concretamente, los BK y SK participan en la regulación de las contracciones neurogénicas de la vejiga humana ya que el bloqueo específico de los BK con IbTx o de los SK con APA producen de igual manera un incremento significativo de las contracciones de la vejiga humana producidas por la EET. Estos resultados son compatibles con estudios anteriores en los que se observó que el bloqueo específico de los BK con IbTx produjo un incremento de las contracciones inducidas por diferentes agonistas en tiras de músculo detrusor de humanos (Darblade y col., 2006), cerdos (Buckner y col., 2002), cobayas (Heppner y col., 1997; Kobayashi y col., 2000; Mora y col., 2005), ratas (Uchida y col., 2005) y ratones (Herrera y col., 2005). Además, se ha mostrado la eficacia de la transferencia del gen que codifica para la subunidad α que constituye el poro del canal BK en un modelo animal de vejiga hiperactiva (Christ col., 2001), apoyando la consideración de los BK como diana terapéutica en el tratamiento de la vejiga hiperactiva. En estudios previos, se ha observado que los SK modulan el potencial de acción tras la hiperpolarización del músculo liso de la vejiga urinaria (Creed y col., 1983; Fujii y col., 1990) y que el bloqueo de estos canales con apamina induce un incremento en la frecuencia del potencial de acción (Creed y col., 1983; Fujii y col., 1990), y en la amplitud de las contracciones fásicas (Zografos y col., 1992; Herrera y col., 2000; Herrera y col., 2002). Además, se ha identificado ARNm de los canales SK2 y SK3 en el músculo liso de la vejiga urinaria de ratón (Ohya y col., 2000). A nivel proteico, los canales SK3 se han localizado en el urotelio y en el músculo liso de la vejiga urinaria (Herrera y col., 2003) y se ha propuesto que estos canales representan un factor determinante en la contractilidad del músculo liso de la vejiga, aunque otras isoformas de los canales SK (SK1, SK2) también han sido implicados en la regulación de la función vesical (Herrera y col., 2003). Además se ha observado que alteraciones en la expresión de los K_{Ca} puede causar disfunciones urinarias, como vejiga hiperactiva o incontinencia urinaria (Herrera y col., 2005). Todo esto sugiere que los BK y SK son activos en la vejiga humana y que su actividad antagoniza las contracciones neurogénicas. Consecuentemente, la activación farmacológica de los BK con NS1619 ó NS-8 causa una inhibición de las contracciones neurogénicas. La modulación de las contracciones de la vejiga por los K_{Ca} parece ser específico de la generada por la estimulación nerviosa ya que los bloqueadores de los K_{Ca} no consiguieron potenciar las contracciones del músculo liso detrusor inducidas por la estimulación de los receptores muscarínicos. Esta evidencia apunta a la existencia de una modulación pre-sináptica de la neurotransmisión colinérgica por los K_{Ca} aunque esta idea necesita ser confirmada. Por el contrario, la activación de los BK con NS-8 fue ineficaz en la

inhibición farmacológica de las contracciones miogénicas inducidas en la vejiga humana a concentraciones que sí son efectivas sobre las respuestas neurogénicas. Este patrón de modulación de la contractilidad de la vejiga humana con los activadores de los K_{Ca} es completamente diferente de los antagonistas muscarínicos o de los activadores de los K_{ATP} que inhiben tanto las contracciones neurogénicas como las miogénicas. La apertura de los BK bajo condiciones fisiológicas permite la hiperpolarización de la membrana celular la cual, a su vez, cierra los canales Ca^{2+} dependientes de voltaje y relaja las células del músculo liso detrusor (Heppner y col., 1997; Hristov y col., 2008; Petkov y col., 2001a; Petkov y col., 2005). El activador de los BK, NS1619, es capaz de modular la excitabilidad celular en neuronas y músculo liso (Edwards y col., 1994; Holland y col., 1996; Macmillan y col., 1995 Yamamura y col., 2001). El NS1619 relaja el músculo liso de la vejiga con una EC_{50} de 10-30 μM (Chang y col., 2010; Huang y col., 1997; Sheldon y col., 1997). La activación de los BK con NS1619 modula las contracciones neurogénicas y las contracciones espontáneas de la vejiga de rata (Soder y col., 2011) y humana (Oger y col., 2011; Hristov y col., 2012). Se ha demostrado que el NS1619 inhibe las contracciones miogénicas de la vejiga humana (Hristov y col., 2012) pero la concentración del activador utilizado en el citado estudio (30 μM) fue más alta que la concentración utilizada en nuestro estudio.

La apertura específica de los SK inhibe las contracciones fásicas y las contracciones miogénicas inducidas por agonistas así como las contracciones neurogénicas de la vejiga humana (Soder y col., 2013). De hecho, el efecto inhibitorio que produce el activador de los IK y SK, NS309, sobre la contracción vesical probablemente está mediada por la activación de los SK, como se ha descrito en vejiga de rata (Parajuli y col., 2013), ya que los IK parece que no tienen una contribución importante en la regulación de las contracciones neurogénicas de la vejiga humana, como se ha sugerido previamente (Afeli y col., 2012) y se ha confirmado por los resultados con el inhibidor de los IK, TRAM-34, aquí mostrados. Aunque las evidencias propias y ajenas sugieren que la activación farmacológica de los SK podría tener relevancia en la modulación de las contracciones neurogénicas de la vejiga humana, los activadores de los BK demuestran una elevada eficacia en modular dichas respuestas. Por tanto, la estimulación de los BK se evaluó en condiciones fisiopatológicas *in vitro* e *in vivo*.

La HBP está asociada al desarrollo de los síntomas del tracto urinario inferior (LUTS) (Guess y col., 1995; Chiricos y col., 1996; Abrams y col., 2003) que tienen un impacto negativo en la calidad de vida (Emberton y col., 2008). Los LUTS relacionados con la HBP son una consecuencia de procesos estáticos (agrandamiento de la próstata) y dinámicos, implicando mecanismos obstructivos e irritativos. De hecho, una importante proporción de pacientes diagnosticados de vejiga hiperactiva tienen HBP como condición subyacente pero no necesariamente relacionada con la obstrucción del tracto urinario (Blaivas y col., 2009). A este respecto, es importante señalar que la inhibición de las contracciones

neurogénicas por los activadores de los BK se manifiesta más claramente en vejigas de pacientes con HBP y síntomas urinarios, demostrando una mayor efectividad de la estimulación de los BK en la inhibición de las contracciones neurogénicas de la vejiga en una población de pacientes que podrían potencialmente beneficiarse de estos efectos. Este hallazgo, junto con el hecho de que los efectos opuestos ejercidos por el bloqueo de los BK es significativamente más notable en vejigas de individuos sanos, apoya la hipótesis que relaciona la vejiga hiperactiva con una reducida actividad/expresión de los BK (Chang y col., 2010, Aydin y col., 2012). Ya que activadores de los K_{Ca} modulan eficazmente la contracción neurogénica de la vejiga pero son vasodilatadores menos efectivos que los activadores de los K_{ATP} , cabría esperarse que produzcan efectos cardiovasculares más leves. Los efectos causados por los activadores de los K_{Ca} sugieren que al menos uno de estos canales debe expresarse en el tejido de la vejiga urinaria. Se ha detectado expresión de las subunidades α y de las subunidades $\beta 1$ - $\beta 4$ de los BK en el músculo liso de vejiga urinaria (Ohya y col., 2000; Ohi y col., 2001a; Ohi y col., 2001b; Petkov y col., 2001; Werner y col., 2007; Chen y col., 2009; Hristov y col., 2011) mientras que la ausencia de estas subunidades incrementa significativamente la contractilidad del músculo liso detrusor y la frecuencia de micción relacionada con la hiperactividad del detrusor (Ratz y col., 2002; Braverman y col., 2003; Di Castro y col., 2006; Petkov y col., 2012). El presente estudio aporta la evidencia de que los BK, IK y SK se expresan en la vejiga humana y de rata, como demuestra la inmunodetección de estos canales en el tejido vesical, confirmando que la disparidad en los efectos de la modulación de los diversos subtipos se debe más a una diferencia funcional de los canales que a la ausencia de alguno de ellos. Curiosamente, aunque el patrón de expresión de los BK e IK en la vejiga de rata no se vio alterado en función del sexo de los animales, el patrón de expresión de los SK en el tejido urinario de rata fue muy diferente dependiendo del sexo, ya que en las ratas macho se detectó una intensa expresión de los SK1 y SK3, mientras que en las ratas hembra sólo se observó una clara expresión del subtipo SK3. Parajuli y col., (2012) detectaron expresión génica (ARNm por RT-PCR) y proteica (inmunohistoquímica) de los SK3 pero no SK1, SK2 ó IK en el músculo liso del detrusor de cobayas. Nosotros hemos demostrado que los K_{Ca} se expresan en el urotelio y el músculo liso de la vejiga de rata, proporcionando la base estructural para considerar la rata un modelo aceptable para evaluar el efecto de la activación de los K_{Ca} en la función urodinámica *in vivo*. En concreto, el activador de los BK, NS-8 se eligió basándonos en su superior efecto inhibitorio sobre las contracciones neurogénicas de la vejiga humana con respecto al activador de los IK/SK, NS-309 o al otro activador de los BK, NS1619. Por otro lado, los efectos inducidos por el NS-8 en los procesos urodinámicos *in vivo* fueron comparados con los efectos producidos por el agente anti-colinérgico OXIB, que ha sido empleado en el tratamiento convencional de la vejiga hiperactiva durante muchos años (Yoshimura y col., 2002). Pese a que la OXIB, como se esperaba, redujo tanto las contracciones neurogénicas y como las

miogénicas inducidas por el CCh en la vejiga humana, no logró, *in vivo*, reducir significativamente la frecuencia de micción ni incrementar el volumen de micción mientras que causó una reducción significativa de la capacidad contráctil de la vejiga en ratas sin irritación vesical, una observación consistente con otras evidencias previas (Angelico y col., 2005). En cambio, en las mismas condiciones, una reducción significativa de la frecuencia de micción y un incremento en el volumen de micción se observó después de la administración del activador de los BK, NS-8, una observación coincidente con lo descrito por Tanaka y col., (2003). El aumento de la capacidad de almacenamiento de la vejiga ejercido por el NS-8 no se acompañó de una alteración de su capacidad contráctil.

Sin embargo, es importante determinar si la activación de los BK puede también mejorar la función urodinámica bajo condiciones de vejiga hiperactiva. Para este propósito evaluamos los efectos *in vivo* de la administración sistémica de NS-8 sobre los parámetros cistométricos en presencia de hiperactividad vesical causada por la infusión de una solución al 0,3% de ácido acético en ratas. La hiperactividad de la vejiga inducida por la irritación química parece tener un claro componente neurogénico, mediado principalmente por fibras aferentes (Mitsui y col., 2001). La administración de NS-8 revierte el perfil hiperactivo de la función urodinámica generada por el ácido acético, una eficacia que, por el contrario, no se alcanza tras el bloqueo muscarínico, ya que la OXIB sólo mejora ligeramente la función urodinámica en estas condiciones. Así mismo, a diferencia de la OXIB, el NS-8 no inhibe significativamente la capacidad máxima de la vejiga para contraerse, lo que sugiere que los problemas de retención de orina observados con los anticolinérgicos (Vande Griend y col., 2012) no sería esperable con este fármaco. Además, el NS-8 muestra un mejor perfil cardiovascular ya que apenas afecta la presión arterial o la frecuencia cardíaca a la dosis utilizada mientras que el agente anticolinérgico provoca una marcada hipotensión y taquicardia. Para el potencial terapéutico de los activadores de los BK, este perfil de seguridad cardiovascular representa una ventaja importante sobre los agentes anticolinérgicos y los activadores de los K_{ATP} . Por lo tanto, la evaluación de la activación de los BK podría ser una estrategia terapéutica de interés en el tratamiento de la vejiga hiperactiva. Así la activación de los K_{Ca} podría tener relevancia terapéutica tanto en el tratamiento de la DE como de los LUTS, dos patologías que coexisten frecuentemente y comparten mecanismos fisiopatológicos comunes (Gacci y col., 2011; Haddad y col., 2015).

- Conclusiones –

Conclusiones

Las principales conclusiones que se extraen del presente trabajo son las siguientes:

1. Los K_{Ca} participan en la vasodilatación causada por la inhibición de la PDE5 en las ARPH, pero no en el CCH y su activación en las ARPH resulta en una potenciación de la capacidad relajadora de la vía del NO/GMP_c y específicamente de la vasodilatación causada por los inhibidores de la PDE5.
2. Este efecto potenciador es dependiente de endotelio e implica específicamente a los K_{Ca} de intermedia y gran conductancia (IK y BK, respectivamente).
3. La diabetes causa un profundo deterioro de las respuestas mediadas por NO/GMP_c en el CCH y las ARPH que resulta en menor eficacia vasodilatadora de los inhibidores de la PDE5.
4. La potenciación de la vasodilatación inducida por sildenafil que produce el activador de los K_{Ca} , NS-8, resulta en una normalización de las respuestas a este inhibidor de la PDE5 en las ARPH de los pacientes diabéticos.
5. La administración sistémica de un activador de los K_{Ca} potencia la eficacia de la inhibición de la PDE5 para aumentar las respuestas eréctiles en ratas normales y paranormalizar la función eréctil en un modelo de DE diabética.
6. Los canales BK y SK modulan las contracciones neurogénicas de la vejiga humana y la activación farmacológica de estos canales disminuye las contracciones neurogénicas sin afectar las contracciones miogénicas y esta disminución de las contracciones neurogénicas por los activadores de los BK es especialmente aplicable a los pacientes que presentan síntomas urinarios.
7. La administración sistémica del activador de los BK, el NS-8, recupera la capacidad de almacenamiento de la vejiga y revierte la hiperactividad de la vejiga inducida químicamente más eficazmente que los antagonistas muscarínicos sin causar alteraciones cardiovasculares.
8. La activación de los K_{Ca} podría constituir una estrategia farmacológica para aumentar la eficacia terapéutica de los inhibidores PDE5. Esto podría tener relevancia clínica en el manejo de pacientes que presentan una menor respuesta a los inhibidores PDE5, como son los pacientes diabéticos. Además, la activación de los BK podría constituir una opción terapéutica para aliviar los síntomas de la vejiga hiperactiva, que frecuentemente se asocia a DE.

- Conclusions -

Conclusions

The main conclusions drawn from the present work are as follows:

1. K_{Ca} contributes to the vasodilatory activity of PDE5 inhibition in HPRA but not in HCC and K_{Ca} stimulation in HPRA results in the potentiation of the NO/cGMP vasodilatory capacity and specifically of vasodilatory capacity of PDE5 inhibitors.
2. This potentiating effect is endothelium dependent and specifically involves intermediate-conductance K_{Ca} and large-conductance K_{Ca} (IK and BK, respectively).
3. Diabetes causes a profound impairment of NO/cGMP-mediated responses in HCC and HPRA that results in reduced vasodilatory capacity of PDE5 inhibitors.
4. The potentiation of sildenafil-induced relaxation by the K_{Ca} activator, NS-8, results in a normalization of responses to this PDE5 inhibitor in HPRA from diabetic patients.
5. *In vivo* administration of K_{Ca} activators enhances the efficacy of PDE5 inhibition to augment erectile responses in non-diabetic rats and to normalize erectile function in diabetic rats.
6. BK and SK channels modulate neurogenic contractions of human bladder and pharmacological activation of these channels inhibits neurogenic contractions without affecting the myogenic contractions and this inhibition of neurogenic contractions induced by BK activators is specially applicable to patients with urinary symptoms.
7. *In vivo* administration of the BK activator, NS-8, results in increased storage capacity of the bladder and reverses chemically induced bladder hyperactivity in rats more efficiently than a muscarinic antagonist without causing cardiovascular alterations.
8. K_{Ca} activation could provide a pharmacological strategy to increase the therapeutic efficacy of PDE5 inhibitors. This could have clinical relevance in the management of patients who display lower response to PDE5 inhibitors, such as diabetic patients. In addition, BK activation could provide a therapeutic strategy to relieve overactive bladder symptoms that are frequently associated with ED.

- Bibliografía -

Bibliografia

Abadal LT, Puig T, Balaguer Vintró I. (2000). Incidence, mortality and risk factors for stroke in the Manresa Study: 28 years of follow-up]. *Rev Esp Cardiol*, 53 (1), 15-20.

Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, Van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. (2003). Standardisation Sub-Committee of the International Continence Society. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology*, 61 (1), 37-49.

Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, Kay G, Laties A, Nathanson NM, Pasricha PJ, Wein AJ. (2006). Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol*, 148, 565-578.

Adaikan PG, Karim SM. (1981). Adrenoceptors in the human penis. *J Auton Pharmacol*, 1, 199-203.

Adeagbo AS. (1999). 1-Ethyl-2-benzimidazolinone stimulates endothelial K_{Ca} channels and nitric oxide formation in rat mesenteric vessels. *Eur J Pharmacol*. 379, 151-159.

Afeli SA, Rovner ES, Petkov GV. (2012). SK but not IK regulate human detrusor smooth muscle spontaneous and nerve-evoked contractions. *Am J Physiol Renal Physiol*. 303, F559–F568.

Ahn GJ, Sohn YS, Kang KK, Ahn BO, Kwon JW, Kang SK y col., (2005). The effect of PDE5 inhibition on the erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Impot Res*, 17, 134-141.

Akingba AG, Burnett AL. (2001). Endothelial nitric oxide synthase protein expression localization, and activity in the penis of the alloxan-induced diabetic rat. *Mol Urol*, 5, 189-197.

Amoroso S, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M. (1990). Glucose, sulfonylureas and neurotransmitter release: Role of ATP-sensitive K_p-channels. *Science*, 247, 852–854.

Andersson KE, Andersson PO, Fovaeus M, Hedlund H, Malmgren A, Sjogren C. (1988). Effects of pinacidil on bladder muscle. *Drugs*. 36, 41-49.

Andersson KE. (1992). Clinical pharmacology of potassium channel openers. *Pharmacol Toxicol*, 70 (4), 244-254.

Anderson KE, Wagner G. (1995). Physiology of penile erection. *Physiol Rev*, 75 (1), 191-236.

Andersson KE, Wein AJ. (2004a). Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev*. 56, 581-631.

Andersson KE, Arner A. (2004b). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology, *Physiol Rev*. 84, 935-986.

Andersson KE. (2007). LUTS treatment: future treatment options. *Neurourol Urodyn*, 26, 934–947.

Angelico, P., Velasco, C., Guarneri, L., Sironi, G., Leonardi, A., Testa, R., (2005). Urodynamic effects of oxybutynin and tolterodine in conscious and anesthetized rats under different cystometrographic conditions. *BMC Pharmacol*, 5, 14-30.

Angulo J, Rodríguez-Mañas L, Peiró C, Neira M, Marin J, Sanchez -Ferrer CF. (1998). Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 358, 529-537.

Angulo J, Cuevas P, La Fuente JM, Pomerol JM, Ruiz-Castañé E, Puigvert A, Gabancho S, Fernández A, Ney P, Sáenz de Tejada I. (2002). Regulation of human penile smooth muscle tone by prostanoid receptors. *Br J Pharmacol*, 136, 23-30.

Bibliografía

Angulo J, Cuevas P, Fernández A, Gabancho S, Videla S, Sáenz de Tejada I. (2003a). Calcium dobesilate potentiates endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation of human penile resistance arteries. *Br J Pharmacol*, 139, 854-862.

Angulo J, Cuevas P, Fernandez A, Gabancho S, Allona A, Martín-Morales A, Moncada I, Videla S, Saenz de Tejada I. (2003b). Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem Biophys Res Commun*, 312, 1202-1208.

Angulo J, Cuevas P, Gabancho S, Gonzalez-Corrochano R, Videla S, Saenz de Tejada I. (2005). Enhancement of both EDHF and NO/cGMP pathways is necessary to reverse erectile dysfunction in diabetic rats. *J Sex Med*, 2, 341-346.

Angulo J, Cuevas P, Fernández A, Allona A, Moncada I, Martín-Morales A, La Fuente JM, de Tejada IS. (2006). Enhanced thromboxane receptor-mediated responses and impaired endothelium-dependent relaxation in human corpus cavernosum from diabetic impotent men: role of protein kinase C activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 319 (2), 783-789.

Angulo J, Peiró C, Cuevas P, Gabancho S, Fernández A, González-Corrochano R, La Fuente JM, Baron AD, Chen KS, Sáenz de Tejada I. (2009). The novel antioxidant, AC3056 (2, 6 - di- t - buty - 4 - ((di methyl - 4 - methoxy phenyl silyl) methy loxy)phenol), reverses erectile dysfunction in diabetic rats and improves NO-mediated responses in penile tissue from diabetic men. *J Sex Med*, 6, 373-387.

Angulo J, González-Corrochano R, Cuevas P, Fernández A, La Fuente JM, Rolo F, Allona A, Sáenz de Tejada I. (2010a). Diabetes exacerbates the functional deficiency of NO/cGMP pathway associated with erectile dysfunction in human corpus cavernosum and penile arteries. *J Sex Med*, 7 (2pt1), 758-768.

Angulo J, Wright HM, Cuevas P, González-Corrochano R, Fernández A, Cuevas B, La Fuente FM, Gupta S, Sáenz de Tejada I. (2010b). Nevibolol dilates human penile arteries and reverses erectile dysfunction in diabetic rats through enhancement of nitric oxide signaling. *J Sex Med*, 7 (8), 2681-2697.

Angulo J, Cuevas P, Fernández A, La Fuente JM, Allona A, Moncada I, Sáenz de Tejada I. (2012). Tadalafil enhances the inhibitory effects of tamsulosin on neurogenic contractions of human prostate and bladder neck. *J Sex Med*. 9, 2293-2306.

Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MS, Ashcroft FM. (2005). Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. *EMBO J*, 24 (2), 229-239.

Archer S, Gragasin F, Wu X, Wang S, McMurtry S, Kim D, Platonov M, Koshal A, Hashimoto K, Campbell W, Falck JR, Michelakis E. (2003). Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Internal Mammary Artery Is 11, 12-Epoxyeicosatrienoic Acid and Causes Relaxation by Activating Smooth Muscle BKCa Channels. *Circulation*, 107, 769-776.

Artom N, Pinna G, Musso NR, Orlandini F, Malasoma P., Uccelli M, Artom A, Rabbia F, Pascale C, Lantieri F, Pende A. (2015). Prevalence of erectile dysfunction in a cohort of Italian hypertensive subjects. *Clin Exp Hypertens*, 29, 1-7.

Ashford MLJ, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ, Hales CN. (1988). Adenosine-5' 0-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflugers Arch*, 412, 297-304.

Ashford MLJ, Bond CT, Blair TA, Adelman JP. (1994). Cloning and functional expression of a rat heart KATP channel. *Nature*, 370, 456-459.

Bibliografia

- Aydin M, Wang HZ, Zhang X, Chua R, Downing K, Melman A, DiSanto ME. (2012). Large-conductance calcium-activated potassium channel activity, as determined by whole-cell patch clamp recording, is decreased in urinary bladder smooth muscle cells from male rats with partial urethral obstruction. *BJU Int.* 110, E402–E408.
- Ayta IA, McKinlay JB, Krane RJ. (1999). The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int*, 84 (1), 50-56.
- Aytaç IA, Araujo AB, Johannes CB, Kleinman KP, McKinlay JB. (2000). Socio economic factors and incidence of erectile dysfunction: findings of the longitudinal Massachusetts Male Aging Study. *Soc Sci Med*, 51 (5), 771-778.
- Azadzoi KM, Saenz de Tejada I. (1991). Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol*, 146, 238-240.
- Azadzoi KM, Goldstein I. (1992). Erectile dysfunction due to atherosclerotic vascular disease: the development of an animal model. *J Urol*, 147, 1675-1681.
- Bacon CG, Hu FB, Giovannucci E, Glasser DB, Mittleman MA, Rimm EB. (2002). Association of type and duration of diabetes with erectile dysfunction in a large cohort of men. *Diabetes Care*, 25 (8), 1458-1463.
- Bahia PK, Suzuki R, Benton DC, Jowett AJ, Chen MX, Trezise DJ, Dickenson AH, Moss GW. (2005). A functional role for small-conductance calcium-activated potassium channels in sensory pathways including nociceptive processes. *J Neurosci*, 25 (14), 3489-3498.
- Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, Turner LA, Price ME, Naylor AM. (1998). Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol*, 159, 2164-2171.
- Bancroft J, Gutierrez P. (1996). Erectile dysfunction in men with and without diabetes mellitus: a comparative study. *Diabet Med*, 13, 84-89.
- Barrett-Connor E. (2005). Heart disease risk factors predict erectile dysfunction 25 years later (the Rancho Bernardo Study). *Am J Cardiol*, 96 (12B), 3M-7M.
- Bayliss M, Wu C, Newgreen D, Mundy AR, Fry CH. (1999). A quantitative study of atropine resistant contractile responses in human detrusor smooth muscle, from stable, unstable and obstructed bladder. *J. Urol*, 162, 1833–1839.
- Becker MN, Brenner R, Atkinson NS. (1995). Tissue-specific expression of *Drosophila* calcium-activated potassium channel. *J Neurosci*. 15, 6250-6259.
- Beckman JS, Koppenol WH. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424–C1437.
- Bender AT, Beavo JA. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*, 58 (3), 488-520.
- Beny JL, Schaad O. (2000). An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol*, 131, 965-973.
- Bergeron ZL, Bingham JP. (2012). Scorpion Toxins Specific for Potassium (K⁺) Channels: A Historical Overview of Peptide Bioengineering. *Toxins (Basel)*, 4 (11), 1082–1119.
- Bernardi HM, M. Fosset, Lazdunski M. (1988). Characterization, purification, and affinity labeling of the brain 3H-glibenclamide-binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 9816–9820.

Bibliografia

- Bernardi H, De Weille JR, Epelbaum J, Mourre C, Amoroso S, Slama A, Fosset M, Lazdunski M. (1993). ATPmodulated K_p channels sensitive to antidiabetic sulfonylureas are present in adenohypophysis and are involved in growth hormone release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 1340–1344.
- Betourne A, Bertholet AM, Labroue E, Halley H, Sun, HS, Lorsignol A, Feng ZP, French RJ, Penicaud L, Lassalle, JM, Frances B. (2009). Involvement of hippocampal CA3 K(ATP) channels in contextual memory. *Neuropharmacology*, 56, 615–625.
- Birder L, Andersson KE. (2013). Urothelial signaling. *Physiol Rev*, 93, 653–680.
- Bivalacqua TJ, Champion HC, Rajasekaran M, Sikka SC, Kadowitz PJ, Doherty PC, Hellstrom WJ. (1999). Potentiation of erectile response and cAMP accumulation by combination of prostaglandin E1 and rolipram, a selective inhibitor of the type 4 phosphodiesterase (PDE 4). *J Urol*, 162, 1848-1855.
- Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ, Champion HC. (2001). Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, 283, 923-927.
- Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Adams D, Namara DB, Abdel-Mageed AB, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. (2003). Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase partially restores nitric oxide synthesis and erectile function in streptozotocin diabetic rats. *J Urol*, 169 (5), 1911-1917.
- Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, Cellek S, Chitaley K, Webb RC et al. (2004). RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 9121-9126.
- Bivalacqua TJ, Liu T, Musicki B, Champion HC, Burnett AL. (2007). Endothelial nitric oxide synthase keeps erection regulatory function balance in the penis. *Eur Urol*, 51 (6), 1732-1740.
- Blaivas JG, Marks BK, Weiss JP, Panagopoulos G, Somaroo C. (2009). Differential diagnosis of overactive bladder in men. *J.Urol*, 182, 2814–2817.
- Blatz AL, Magleby KL. (1986). Calcium activated potassium channels. *Nature*, 323, 718-720.
- Blount MA, Beasley A, Zoraghi R, Sekhar KR, Bessay EP, Francis SH, Corbin JD. (2004). Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation. *Mol Pharmacol*. 66 (1), 144-152.
- Bonev AD, Nelson MT. (1993). ATP-sensitive potassium channels in smooth muscle cells from guinea pig urinary bladder. *Am J Physiol*, 264, C1190-C1200.
- Boolell M, Gepi-Attee S, Gingell JC, Allen MJ. (1996). Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br J Urol*, 78, 257-261.
- Bortolotti A, Parazzini F, Colli E, Landoni M. (1997). The epidemiology of erectile dysfunction and its risk factors. *Int J Androl*, 20, 323-334.
- Bosch X, Alfonso F, Bermejo J. (2002). Diabetes and cardiovascular disease. A comprehensive insight to the new epidemic of the 21st century]. *Rev Esp Cardiol*, 55 (5), 525-527.
- Boulanger CM, Vanhoutte PM. (1997). G-proteins and endothelium-dependent relaxations. *J Vascul Res*, 34, 175-185.
- Brading AF. (1997). A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology*. 50 (Suppl 6A), 57-67.

Bibliografia

Brakemeier S, Kersten A, Eichler I, Grgic I, Zakrzewicz A, Hopp H, y col., (2003). Shear stress-induced up-regulation of the intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in human endothelium. *Cardiovasc Res*, 60, 488–496.

Braun MH, Sommer F, Haupt G, Mathers MJ, Reifenrath B, Engelmann UH. (2003). Lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction: co-morbidity or typical "Aging Male" symptoms? Results of the "Cologne Male Survey". *Eur Urol*, 44 (5), 588-594.

Braverman AS, Ruggieri MR Sr. (2003). Hypertrophy changes the muscarinic receptor subtype mediating bladder contraction from M3 toward M2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285 (3), R701-R708.

Brenner R., Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW. (2000). Vasoregulation by the B1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, 407, 870-876.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. (2001). *Nature*, 414, 813–820.

Brune ME, Fey TA, Brioni JD, Sullivan JP, Williams M, Carroll WA, Coghlan MJ, Gopalakrishnan M. (2002). (9S) - 9- (3-Bromo-4-fluorophenyl) - 2, 3, 5, 6, 7, 9-hexahydrothieno [3, 2-b]quinolin-8(4H) – one 1, 1 – dioxide (A-278637), a novel ATP-sensitive potassium channel opener efficaciously suppressing urinary bladder contractions. II. In vivo characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 387-394.

Bschleipfer T, Schukowski K, Weidner W, Grando SA, Schwantes U, Kummer W y col., (2007). Expression and distribution of cholinergic receptors in the human urothelium. *Life Sci*, 80, 2303-2307.

Buckner SA, Milicic I, Daza Av, Coghlan MJ, Gopalakrishnan M. (2002). Spontaneous phasic activity of the pig urinary bladder smooth muscle: characteristics and sensitivity to potassium channel modulators. *Br J Pharmacol*, 135, 639-648.

Burke A, Fitzgerald GA. (2003). Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis*, 46, 79–90.

Burnelt AL. (1997). Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. *J Urol*, 157, 320-324.

Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. (1992). Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*, 257, 401-403.

Burnett AL, Tillman SL, Chang TS, Epstein JI, Lowenstein CJ, Bredt DS, Snyder SH, Walsh PC. (1993). Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol*, 150, 73-76.

Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, Liu JX, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. (1996). Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol Med*, 2, 288-296.

Burnett AL, Strong TD, Trock BJ, Jin L, Bivalacqua TJ, Musicki B. (2009). Serum biomarker measurements of endothelial function and oxidative stress after daily dosing of sildenafil in type 2 diabetic men with erectile dysfunction. *J Urol*, 181 (1), 245-251.

Burnham BP, Bychkov R, Félétou M, Richards GR, Vanhoutte PM, Weston AH, Edwards G. (2002). Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF. *Br J Pharmacol*, 135, 1113-1143.

Bibliografía

- Bychkov R, Burnham PB, Richard GR, Edwards G, Arthur HW, Félétou M, Vanhoutte PM. (2002). Characterization of a charybdotoxin-sensitive intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in porcine coronary endothelium: relevance to EDHF. *Br J Pharmacol*, 137, 1346-1354.
- Cai S, Garneau L, Sauvé R (1998). Single-channel characterization of the pharmacological properties of the $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$ channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J Membr Biol*, 163, 147–158.
- Calebiro D, Nikolaev VO, Lohse MJ. (2010). Imaging of persistent cAMP signaling by internalized G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol*, 45 (1), 1-8.
- Cao Y, Dreixler JC, Roizen JD, Roberts MT, and Houamed KM. (2001). Modulation of recombinant small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels by the muscle relaxant chlorzoxazone and structurally related compounds. *J Pharmacol Exp Ther*, 296, 683-689.
- Carretero M. (2004). Vejiga hiperactiva. Tratamiento con antagonistas competitivos de los receptores muscarínicos. *OFFARM*, 23 (4), 149-152.
- Carson CC. (2006). PDE5 inhibitors: are there differences? *Can J Urol*, 13 (Supl 1), 34-39.
- Cartledge JJ, Eardley I, Morrison JF. (2000). Impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation by glycosylated human haemoglobin. *BJU Int*, 85, 735-741.
- Cartledge JJ, Eardley I, Morrison JF. (2001). Advanced glycation end-products are responsible for the impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation seen in diabetes. *BJU Int*, 87, 402-407.
- Castle NA, Haylett DG, Morgan JM, Jenkinson DH. (1993). Dequalinium: a potent inhibitor of apamin-sensitive K^{+} channels in hepatocytes and of nicotinic responses in skeletal muscle. *Eur J Pharmacol*, 236 (2), 201-207.
- Castro D, España M, Prieto M, Badia X. (2005). Prevalencia de Vejiga Hiperactiva en España: Estudio poblacional. *Arch Esp Urol*, 58, 131-138.
- Cellek S, Moncada S. (1997). Modulation of noradrenergic responses by nitric oxide from inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 1, 204-210.
- Cellek S, Rodrigo J, Lobos E, Fernandez P, Serrano J, Moncada S.(1999). Selective nitrenergic neurodegeneration in diabetes mellitus a nitric oxide dependent phenomenon. *Br J Pharmacol*. 128, 1804-1812.
- Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. (1987). Glucose and aging. *Sci Am*, 256, 90-96.
- Chandel A, Dhindsa S, Topiwala S, Chaudhuri A, Dandona P.(2008). Testosterone concentration in young patients with diabetes. *Diabetes Care*, 31, 2013-2017.
- Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington MW, Gutman GA, Cahalan MD. (2004). K^{+} channel as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci*, 25, 280-289.
- Chang CP, Dworetzky SI, Wang J, Goldstein ME. (1997). Differential expression of the alpha and beta subunits of the large conductance calcium-activated potassium channel: implications for channel diversity. *Molecular Brain Research*, 45, 33-40.
- Chang S, Hypolite JA, Changolkar A, Wein AJ, Chacko S, DiSanto ME. (2003). Increased contractility of diabetic rabbit corpora smooth muscle in response to endothelin is mediated via Rho-kinase beta. *Int J Impot Res*, 15, 53-62.

Bibliografia

- Chang S, Hypolite JA, Velez M, Changolkar A, Wein AJ, Chacko S, DiSanto ME (2004). Downregulation of cGMP-dependent protein kinase-1 activity in the corpus cavernosum smooth muscle of diabetic rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287 (4), R950-R960.
- Chang S, Gomes CM, Hypolite JA, Marx J, Alanzi J, Zderic SA, Malkowicz B, Wein AJ, Chacko S. (2010). Detrusor overactivity is associated with down-regulation of large-conductance calcium- and voltage-activated potassium channel protein. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298, F1416–F1423.
- Chapple CR, Yamanishi T, Chess-Williams R. (2002). Muscarinic receptor subtypes and management of the overactive bladder *Urology*, 60 (Suppl 1), 82-88.
- Chauhan SD, Hobbs AJ, Ahluwalia A. (2004). C-type natriuretic peptide: new candidate for endothelium-derived hyperpolarising factor. *Int J Biochem Cell Biol*, 36 (10), 1878-1881.
- Chen G, Suzuki H, Weston AH. (1988). Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol*, 95, 1165-1174.
- Chen MX, Gorman SA, Benson B, Singh K, Hieble JP, Michel MC, Tate SN, Trezise DJ. (2004). Small and intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, 602-615.
- Chen M, Petkov GV. (2009). Identification of large conductance calcium activated potassium channel accessory beta4 subunit in rat and mouse bladder smooth muscle. *J Urol*, 182 (1), 374-377.
- Chess Williams R. (2002). Muscarinic receptors of the urinary bladder, detrusor, urothelial, and projectional. *Auton Autocoid Pharmacol*, 22, 133-145.
- Chicchi GG, Gimenez- Gallego G, Ber E, Garcia ML, Winquist R, Cascieri MA. (1988). Purification and characterization of a unique, potent inhibitor of apamin binding from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom. *J Biol Chem*, 263 (21), 10192-10197.
- Chiricos TN, Sanford E. (1996). Cost consequences of surveillance, medical management or surgery for benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 155, 1311–1316.
- Cho SY, Kim SW. (2010). Time-dependent Changes in Erectile Function and Responsiveness to Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Korean J Androl*, 28 (2), 85-92.
- Christ GJ, Maayani S, Valcic M, y col., (1990). Pharmacological studies of human erectile tissue: characteristics of spontaneous contractions and alterations in alpha-adrenoceptor responsiveness with age and disease in isolated tissues. *Br J Pharmacol*, 101, 375-381.
- GJ, Spray DC, Brink PR. (1993). Characterization of K currents in cultured human corporal smooth muscle cells. *J Androl*, 14, 319-328.
- Christ GJ, Day N, Santizo C, Sato Y, Zhao W, Sclafani T, Bakal R, Salman M, Davies K, Melman A. (2004). Intracorporal injection of hSlo cDNA restores erectile capacity in STZ-diabetic F-344 rats in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287, H1544-H1553.
- Christ GJ, Andersson KE, Williams K, Zhao W, D'Agostino R Jr, Kaplan J, Aboushwareb T, Yoo J, Calenda G, Davies KP, Sellers RS, Melman A. (2009). Smooth-muscle-specific gene transfer with the human maxi-k channel improves erectile function and enhances sexual behavior in atherosclerotic cynomolgus monkeys. *Eur Urol*, 56 (6), 1055-1066.

Bibliografía

- Clement IV, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J. (1997). Association and Stoichiometry of KATP Channel Subunits. *Neuron*, 18, 827-838.
- Climent B, Schubert R, Stankevicius E, García-Sacristán A, Simonsen U, Rivera L. (2012). Large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels modulate endothelial cell outward currents and nitric oxide release in the intact rat superior mesenteric artery. *Biochem Biophys Res Commun*, 417 (3), 1007-1013.
- Colin G. Nichols. (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature*, 440, 470-476.
- Conti M, Beavo J. (2007). Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annu. Rev. Biochem*, 76, 481-511.
- Cook DL, Hales N. (1984). Intracellular ATP directly blocks K_1 channels in pancreatic B-cells. *Nature*, 311, 271-273.
- Cook NS, Haylett DG. (1985). Effects of apamin, quinine and neuromuscular blockers on calcium-activated potassium channel in guinea-pig hepatocytes. *J Physiol*, 358, 373-394.
- Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH. (2004). Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). *Neurochem Int*, 45 (6), 859-863.
- Corona G, Mannucci E, Petrone L, Balercia G, Paggi F, Fisher AD, Lotti F, Chiarini V, Fedele D, Forti G, Maggi M. (2007). NCEP-ATPIII-defined metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and prevalence of hypogonadism in male patients with sexual dysfunction. *J Sex Med*, 4 (4 Pt 1), 1038-1045.
- Corona G, Mannucci E, Forti G, Maggi M. (2009). Following the common association between testosterone deficiency and diabetes mellitus, can testosterone be regarded as a new therapy for diabetes? *Int J Androl*, 32 (5), 431-441.
- Coskran TM, Morton D, Menniti FS, Adamowicz WO, Kleiman RJ, Ryan AM, Strick CA, Schmidt CJ, Stephenson DT. (2006). Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 10A (PDE10A) in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem*, 54, 1205-1213.
- Costa C, Soares R, Castela A, Adães S, Hastert V, Vendeira P, Virag R. (2009). Increased endothelial apoptotic cell density in human diabetic erectile tissue—comparison with clinical data. *J Sex Med*, 6, 826-835.
- Creed KE, Ishikawa S, Ito Y. (1983). Electrical and mechanical activity recorded from rabbit urinary bladder in response to nerve stimulation. *J Physiol*, 338, 149-164.
- Cuéllar de León AJ, Ruiz García V, Campos González JC, Pérez Hoyos S, Brotons Multó F. (2002). Prevalence erectile dysfunction in patients with hypertension]. *Med Clin (Barc)*, 119 (14), 521-526.
- Curley M, Cairns MT, Friel AM, McMeel O M, Morrison JJ, Smith, TJ. (2002) Expression of mRNA transcripts for ATPsensitive potassium channels in human myometrium. *Mol Hum Reprod*, 8, 941-945.
- Dail WG, Barba V, Leyba L, Galindo R. (1995). Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res*, 282, 109-116.
- Dale TJ, Cryan JE, Chen MX, Trezise DJ. (2002). Partial apamin sensitivity of human small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 366 (5), 470-477.
- Daley JT, Brown ML, Watkins MT, Traish AM, Huang Y-H, Moreland RB, Saenz de Tejada I. (1996). Prostanoid production in rabbit corpus cavernosum: I. Regulation by oxygen tension. *J Urol*, 155, 1482-1487.

Bibliografía

- Darblade B, Behr-Roussel D, Oger S, Hieble JP, Lebre T, Gorny D, Benoit G, Alexandre L, Giuliano F. (2006). Effect of potassium channel modulators on human detrusor smooth muscle myogenic phasic contractile activity: potential therapeutic targets for overactive bladder. *Urology*, 68, 442–448.
- Davda RK, Stepniakowski KT, Lu G, Ullian ME, Goodfriend TL, Egan BM. (1995). Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension*, 26, 764–770.
- De Angelis L, Marfella MA, Siniscalchi M, Marino L, Nappo F, Giugliano F y col. (2001) Erectile and endothelial dysfunction in Type II diabetes: a possible link. *Diabetologia*, 44, 1155-1160.
- De Berardis G, Pellegrin F, Franciosi M, Belfiglio M, Di Nardo B, Greenfield S, Kaplan SH, Rossi MC, Sacco M, Tognoni G, Valentini M, Nicolucci A. (2003). Identifying patients with type 2 diabetes with a higher likelihood of erectile dysfunction: the role of the interaction between clinical and psychological factors. *J Urol*, 169, 1422-1428.
- De Groat WC, Yoshiyama M, Ramage AG, Yamamoto T, Somogyi GT. (1999). Modulation of voiding and storage reflexes by activation of alpha1-adrenoceptors. *Eur Urol*, 36 (Suppl 1), 68-73.
- De Groat WC. (2004). The urothelium in overactive bladder: passive bystander or active participant? *Urology*, 64 (Suppl 1), 7-11.
- Deutsch S, Sherman L. (1980). Previously unrecognized diabetes mellitus in sexually impotent men. *JAMA*, 244, 2430-2432.
- De Young L, Yu D, Freeman D, Brock GB. (2003). Effect of PDE5 inhibition combined with free oxygen radical scavenger therapy on erectile function in a diabetic animal model. *Int J Impot Res*, 15, 347-354.
- De Young LX, Domes T, Lim K, Carson J, Brock GB. (2008). Endothelial rehabilitation: the impact of chronic PDE5 inhibitors on erectile function and protein alterations in cavernous tissue of diabetic rats. *Eur Urol*, 54, 213-220.
- Di Castro A, Drew LJ, Wood JN, Cesare P. (2006). Modulation of sensory neuron mechanotransduction by PKC- and nerve growth factor-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (12), 4699-4704.
- Dick GM, Sanders KM. (2001). (Xeno)estrogen sensitivity of smooth muscle BK channels conferred by the regulatory beta1 subunit: a study of beta1 knockout mice. *J Biol Chem*, 276, 44835-44840.
- Ditropan® (oxybutynin chloride) tablets and syrup [prescribing information] Mountain View, CA: ALZACorp; (2008). http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/017577s034,018211s017,020897s018lbl.pdf
- Dixon JS, Jen PY. (1995). Development of nerves containing nitric oxide synthase in the human male urogenital organs. *Br J Urol*, 76 (6), 719-725
- Dopico AM. (2003). Ethanol sensitivity of BK(Ca) channels from arterial smooth muscle does not require the presence of the β 1-subunit. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C1468-C1480.
- Dorsey P, Keel C, Klavens M, Hellstrom WJ. (2010). Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors for the treatment of erectile dysfunction. *Expert Opin Pharmacother*, 11 (7), 1109-1122.
- Dousa TP. (1999). Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int*, 55 (1), 29-62.
- Du Z, Fujiyama C, Chen Y, Masaki Z. (2003). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in human normal, benign, and malignant prostate tissue. *Chin Med J (Engl)*. 116 (12), 1936-1939.

Bibliografia

Dunn PM. (1999). UCL 1684: a potent blocker of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat adrenal chromaffin cells in culture. *Eur J Pharmacol*, 368, 119-123.

.Dunsmuir WD, Holmes SAV. (1996). The aetiology and management of erectile, ejaculatory and fertility problems in men with diabetes mellitus. *Diabet Med*, 13, 700-708.

Eardley I, Cartledge J. (2002). Tadalafil (Cialis) for men with erectile dysfunction. *Int J Clin Pract*, 56, 300-304.

Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. (1988). K^{+} is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, 396, 269-272.

Edwards G, Niederste-Hollerberg A, Scheneider J, Noack T, Weston AH. (1994). Ion channel modulation by NS1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 113, 1538-1547.

Eichler I, Wibawa J, Grgic I, Knorr A, Brakemeier S, Pries AR, Hoyer J, Köhler R. (2003). Selective blockade of endothelial Ca^{2+} -activated small- and intermediate-conductance K^{+} -channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol*, 138 (4), 594-601.

Elesber AA, Solomon H, Lennon RJ, Mathew V, Prasad A, Pumper G, Nelson RE, McConnell JP, Lerman LO, Lerman A. (2006). Coronary endothelial dysfunction is associated with erectile dysfunction and elevated asymmetric dimethylarginine in patients with early atherosclerosis. *Eur Heart J*, 27 (7), 824-831.

El-Sakka AI (2004). Efficacy of sildenafil citrate in treatment of erectile dysfunction: effect of type 2 diabetes. *Eur Urol*, 46, 503–509.

El-Sakka AI, Sayed HM, Tayeb KA. (2009). Androgen pattern in patients with type 2 diabetes-associated erectile dysfunction: impact of metabolic control. *Urology*, 274, 552-560.

El Sakka AI. (2011). Reversion of penile fibrosis: Current information and a new horizon. *Arab Journl of urology*, 9, 49-55.

Emberton, M.,Cornel,E.,Bassi,P.,Fourcade,R.O.,Gómez,J.M.,Castro,R.,2008. Benign prostatic hyperplasia as a progressive disease: a guide to the risk factors and options for medical management. *Int.J.Clin.Pract.*62,1076–1086.

Enzlin P, Mathieu C, Van Den BA, Vanderschueren D, Demyttenaere K.(2003). Prevalence and predictors of sexual dysfunction in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26,409-414.

Escrig A, Marin R, Abreu P, Gonzalez-Mora JL, Mas M. (2002). Changes in mating behavior, erectile function, and nitric oxide levels in penile corpora cavernosa in streptozotocin-diabetic rats. *Biol Reprod*, 66, 185-189.

Fabiyi AC, Gopalakrishnan M; LynchIII JJ, Brioni,JD, Coghlan MJ, Brune M.E, (2003) .In vivo evaluation of hepotency and bladder-vascular selectivity of the ATP-sensitive potassium channel openers (-)-cromakalim, ZD6169 and WAY- 133537 in rats.*BJU Int*, 91, 284–290.

Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, and Aiyar J. (1999). Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1 . *J Biol Chem*, 274, 5746-5754.

Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA, Phillips SC. (2000). Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3702–3707.

Fazio L, Brock G. (2004). Erectile dysfunction: management update. *CMAJ*, 170, 1424-1437.

Bibliografia

- Fedele D, Bortolotti A, Coscelli C, Santeusano F, Chatenoud L, Colli E, Lavezzari M, Landoni M, Parazzini F. (2000). Erectile dysfunction in type 1 and type 2 diabetics in Italy. On behalf of Gruppo Italiano Studio Deficit Erettile nei Diabetici. *Int J Epidemiol* 29,524-531.
- Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. (1994). Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*, 151, 54-61.
- Feldman HA, Johannes CB, Derby CA, Kleinman KP, Mohr BA, Araujo AB, McKinlay JB. (2000). Erectile dysfunction and coronary risk factors: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Prev Med*, 30 (4), 328-338.
- Félétou M, Vanhoutte PM. (1988). Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 93, 515-524.
- Félétou M, Vanhoutte PM. (2009). EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)*, 117 (4), 139-155.
- Fernández F, Romero JC, Sánchez A. Disfunción sexual erétil. En: Romero JC. (2000). Complicaciones neurológicas de la diabetes mellitus. Unidata, Sassari, 101-124.
- Fibbi B, Morelli A, Marini M, Zhang XH, Mancina R, Vignozzi L, Filippi S, Chavalmane A, Silvestrini E, Colli E, Adorini L, Vannelli GB, Maggi M. (2008). Atorvastatin but not elocalcitol increases sildenafil responsiveness in spontaneously hypertensive rats by regulating the RhoA/ROCK pathway. *J Androl*. 29 (1), 70-84.
- Fibbi B, Morelli A, Vignozzi L, Filippi S, Chavalmane A, De Vita G, Marini M, Gacci M, Vannelli GB, Sandner P, Maggi M. (2010). Characterization of phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in the human male lower urinary tract. *J Sex Med.*, 7(1 Pt 1), 59-69.
- Finberg JP, Levy S, Vardi Y. (1993). Inhibition of nerve stimulation-induced vasodilatation in corpora cavernosa of the pithed rat by blockade of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, 108, 1038-1042.
- Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, 401, 493-497.
- Fonseca V, Seftel A, Denne J, Fredlund P. (2004). Impact of diabetes mellitus on the severity of erectile dysfunction and response to treatment: analysis of data from tadalafil clinical trials. *Diabetologia*, 47 (11), 1914-1923.
- Francis SH, Turko IV, Corbin JD. (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 65, 1-52.
- Francis SH, Corbin JD. (2005) Sildenafil: efficacy, safety, tolerability and mechanism of action in treating erectile dysfunction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 1 (2), 283-293.
- Frankel SJ, Donovan JL, Peters TI, y col., (1998). Sexual dysfunction in men with lower urinary tract symptoms. *J Clin Epidemiol*, 51, 677-685.
- Frazier EP, Peters SL, Braverman AS, et al. (2008). Signal transduction underlying the control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors and β -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 377, 449-62.
- Frey BW, Carl A & Publicover NG. (1998) Charybdotoxin block of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in colonic muscle depends on membrane potential dynamics. *Am J Physiol* 274, C673-C680.
- Frindt G, Palmer LG. (1987). Ca -activated K channels in apical membrane of mammalian CCT, and their role in K secretion. *Am J Physiol*, 252 (3 Pt 2), F458-F467.

- Fujii K, Foster CD, Brading AF, Parekh AB. (1990). Potassium channel blockers and the effects of cromakalim on the smooth muscle of the guinea-pig bladder. *Br J Pharmacol*, 99 (4), 779-785.
- Fujishige K, Kotera J, Yuasa K, Omori K. (2000). The human phosphodiesterase PDE10A gene genomic organization and evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains. *Eur J Biochem*, 267, 5943–5951.
- Fujita A, Takeuchi T, Saitoh N, Hanai J, Hata F. (2001). Expression of Ca²⁺-activated K⁺ channels, SK3, in the interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Cell Physiol*, 203, C1727-C1733.
- Fusco F, Sicuteri R, Rossi A, Kontodimas S, Haro JM, Imbimbo C, Mirone V; Italian EDOS Study Group. (2009). Patterns of treatment with PDE5 inhibitors in the clinical practice in Italy: longitudinal data from the Erectile Dysfunction Observational Study. *Asian J Androl*, 11 (5), 629-637.
- Gacci M, Eardley I, Hatzichristou D, Kaplan SA, Maggi M, McVary KT, Mirone V., Porst H., Roehrborn C.G., (2011). Critical analysis of the relationship between sexual dysfunctions and lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia. *Eur. Urol*, 60, 809–825
- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem*, 265, 11083-11090.
- Ganz MB, Seftel A. (2000). Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278, E146-E152.
- Garban H, Marquez D, Cai L, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF (1995). Restoration of normal adult penile erectile response in aged rats by long-term treatment with androgens. *Biol Reprod*, 53, 1365–1372.
- García-Cruz E, Piqueras M, Gosálbez D, Pérez-Márquez M, Peri L, Izquierdo L, Franco A, Luque P, Corral JM, Alvarez-Vijande R, Alcaraz A. (2012). Erectile dysfunction and its severity are related to the number of cardiovascular risk factors. *Actas Urol Esp*, 36 (5), 291-295.
- Gardos G. (1956). The permeability of human erythrocytes to potassium. *Acta Physiol Hung*. 10 (2-4): 185-189.
- Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. (2011). EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol*, 164, 839-852.
- Gauthier KM, Liu C, Popovic A, Albarwani S, Rusch NJ. (2002). Freshly isolated bovine coronary endothelial cells do not express the BKCa channel gene. *J Physiol*, 545, 829–836.
- Gehlert DR, Mais DE, Gackenhimer SL, Krushinski JH, Robertson DW. (1990). Localization of ATP sensitive potassium channels in the rat brain using a novel radioligand, 125I.iodoglibenclamide. *Eur J Pharmacol*, 186, 373–375.
- Ghafar MA, Anastasiadis AG, Olsson LE, Chichester P, Kaplan SA, Buttyan R, Levin RM. (2002). Hypoxia and an angiogenic response in the partially obstructed rat bladder. *Lab Invest*, 82 (7), 903-909.
- Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol, Ther* 110, 103–116.
- Giangiacomo KM, Garcia ML, McManus OB. (1992). Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry*, 31 (29), 6719–6727.

Bibliografía

Giangiacomo KM, Fremont V, Mullmann TJ, Hanner M, Cox RH, Garcia ML. (2000). Interaction of charybdotoxin S10A with single maxi-K channels: kinetics of blockade depend on the presence of the beta 1 subunit. *Biochemistry*, 39 (20), 6115-6122.

Gillespie KM. (2006). Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ*, 175 (2), 165-170.

Jimenez-Gallego G, Navia MA, Reuben JP, Katz GM, Kaczorowski GJ, Garcia ML. (1988). Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (10), 3329-3333.

Giovannoni MP, Vergelli C, Graziano A, Dal Piaz V. (2010). PDE5 inhibitors and their applications. *Curr Med Chem*, 17(24), 2564-2587.

Gocmen C, Secilmis A, Kumcu EK, Ertug PU, Onder S, Dikmen A, Baysal F.(2000). Effects of vitamin E and sodium selenate on neurogenic and endothelial relaxation of corpus cavernosum in the diabetic mouse. *Eur J Pharmacol*, 398, 93-98.

Goldstein I, Feldman MI, Deckers PJ, y col., Radiation-associated impotence. A clinical study of its mechanism. *Jama* 1984, 251:903.

Goldstein I. (2000). Oral phentolamine: an alpha -1, alpha-2 adrenergic antagonist for the treatment of erectile dysfunction. *Int J Imp Res*, 12 (suppl 1), S75-S80.

Goldstein I, Young JM, Fischer J, Bangerter K, Segerson T, Taylor T. (2003). Vardenafil a new phosphodiesterase type 5 inhibitor, in the treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: A multicenter double-blind placebo-controlled fixed-dose study. *Diabetes Care*, 26, 777-783.

Golomb J. (2000). Treatment of the overactive bladder with detrusitol]. *Harefuah*, 139 (11-12), 467-470.

Gonzalez-Cadavid NF, Burnett AL, Magee TR, Zeller CB, Vernet D, Smith N, Gitter J, Rajfer J. (2000). Expression of penile neuronal nitric oxide synthase variants in the rat and mouse penile nerves. *Biol Reprod*, 63, 704-714.

Gopalakrishnan M, Buckner SA, Whiteaker KL, Shieh CC, Molinari EJ, Milicic I, Daza AV, Davis-Taber R, Scott VE, Sellers D, Chess-Williams R, Chapple CR, Liu Y, Liu D, Brioni JD, Sullivan JP, Williams M, Carroll WA, Coghlan MJ. (2002). (-)-(9S)-9-(3-Bromo-4-fluorophenyl)-2,3,5,6,7,9-hexahydrothieno[3,2-b]quinolin-8(4H)-one 1,1-dioxide (A-278637): a novel ATP-sensitive potassium channel opener efficacious in suppressing urinary bladder contractions. I. In vitro characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, 303 (1), 379-386.

Gragasin FS, Michelakis ED, Hogan A, Moudgil R, Hashimoto K, Wu X, Bonnet S, Haromy A, Archer SL. (2004). The neurovascular mechanism of clitoral erection: nitric oxide and cGMP-stimulated activation of BKCa channels. *FASEB J*, 18 (12), 1382-1391.

Gragasin FS, Michelakis ED, Hogan A, Moudgil R, Hashimoto K, Grgic I, Eichler I, Heinau P, Si H, Brakemeier S, Hoyer J y col., (2005). Selective blockade of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 704-709.

Gratzke C, Angulo J, Chitale K, Dai YT, Kim NN, Paick JS, Simonsen U, Uckert S, Wespes E, Andersson KE, Lue TF, Stief CG. (2010). Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med*, 7(1 Pt 2), 445-475.

Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R. (2009). Endothelial Ca⁺⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol*, 157 (4), 509-526.

Bibliografía

- Gribkoff VK, Lum-Ragan JT, Boissard CG, Post-Munson DJ, Meanwell NA, Starrett JE Jr, Kozlowski ES, Romine JL, Trojnacki JT, McKay MC, Zhong J, Dworetzky SI. (1996). Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels. *Mol Pharmacol*, 50,206-217.
- Gribkoff VK, Starrett JE, Dworetzky SI. (1997). The pharmacology and molecular biology of large-conductance calcium-activated (BK) potassium channels. *Adv Pharmacol* 37, 319-348.
- Gross-Langenhoff M, Hofbauer K, Weber J, Schultz A, Schultz JE. (2006). cAMP is a ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11. *J Biol Chem*, 281, 2841–2846.
- Grunnet M, Knaus HG, Solander C, Klaerke DA. (1999). Quantification and distribution of Ca (2+)-activated maxi K(+) channels in rabbit distal colon. *Am J Physiol*, 277 (1 Pt1), G22-G30.
- Grunnet M, Jespersen T, Angelo K, Frøkjaer-Jensen C, Klaerke DA, Olesen SP, Jensen BS. (2001). Pharmacological modulation of SK3 channels. *Neuropharmacology*. 2001, (7), 879-887.
- Grunnet M, Hay-Schmidt A, Klaerke DA (2005). Quantification and distribution of big conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in kidney epithelia. *Biochim Biophys Acta*, 1714 (2), 114-124.
- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 320, 454-456.
- Guagnini F, Ferazzini M, Grasso M, Blanco S, Croci T.(2012). Erectile properties of the Rho-kinase inhibitor SAR407899 in diabetic animals and human isolated corpora cavernosa. *J Transl Med*, 10, 59-69
- Guess HA (1995) Epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am*, 22, 247–261
- Gupta S, Moreland RB, Munarriz R, Daley J, Goldstein I, Saenz de Tejada I. (1995). Possible role of Na⁺-K⁺ ATPase in the regulation of human corpus cavernosum smooth muscle contractility by nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 116, 2201-2206.
- Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, y col., (2002). Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 105:1656–1662.
- Hackin, GJ.(1996). Diabetic sexual dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25, 379-400.
- Haddad A, Jabbour M, Bulbul M. (2015). Phosphodiesterase type 5 inhibitors for treating erectile dysfunction and lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: A comprehensive review. *Arab J Urol*, 13 (3), 155-161.
- Hale TM, Okabe H, Heaton JP y col.,(2001). Antihypertensive drugs induce structural remodeling of the penile vasculature. *J Urol*, 166, 739-745.
- Hall SA, Kupelian V, Rosen RC, Travison TG, Link CL, Miner MM, Ganz P, McKinlay JB.(2009). Is hyperlipidemia or its treatment associated with erectile dysfunction? Results from the Boston Area Community Health (BACH) Survey. *J Sex Med*. 6 (5), 1402-1413.
- Hamburg, NM, Vita, JA. (2006). Endothelial dysfunction in atherosclerosis: Mechanisms of impaired nitric oxide bioactivity. In: Loscalzo, J., editor. *Molecular mechanisms of atherosclerosis*. London, 95-110.

Bibliografía

- Hannan JL, Albersen M, Kutlu O, Gratzke C, Stief CG, Burnett AL, Lysiak JJ, Hedlund P, Bivalacqua TJ. (2013). Inhibition of Rho-kinase improves erectile function, increases nitric oxide signaling and decreases penile apoptosis in a rat model of cavernous nerve injury. *J Urol*, 189 (3), 1155-1161.
- Hayashi K, Takamizawa K, Nakamura T, y col.. (1987). Effects of elastase on the stiffness and elastic properties of arterial walls in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 166, 259-267.
- Haynes JM, Cook A L. (2006). Protein kinase G-induced activation of K (ATP) channels reduces contractility of human prostate tissue. *Prostate*, 66, 377–385.
- He J, Reynolds K, Chen J, Chen CS, Wu X, Duan X, Reynolds R, Bazzano LA, Whelton PK, Gu D. (2007). Cigarette smoking and erectile dysfunction among Chinese men without Clinic Vascular Disease. *Am J Epidemiol*, 166, 803–809.
- Hecht MJ, Neundorfer B, Kiesewetter F, Hilz MJ. (2001). Neuropathy is a major contributing factor to diabetic erectile dysfunction. *Neurol Res*, 23, 651-654.
- Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. (1994). Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol*, 481, 407-414.
- Hedlund H, Andersson KE. (1985a). Contraction and relaxation induced by some prostanoids in isolated human penile erectile tissue and cavernous artery. *J Urol*, 134, 1245-1250.
- Hedlund H, Andersson KE. (1985b). Effects of some peptides on isolated human penile erectile tissue and cavernous artery. *Acta Physiol Scand*, 124 (3), 413-419.
- Hedlund H, Andersson KE (1985). Comparison of the responses to drugs acting on adrenoreceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. *J Auton Pharmacol* 5:,81–88.
- Hedlund P, Alm P, Andersson KE. (1999). NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. *Br J Pharmacol*, 127, 349-360.
- Hedlund P, Ny L, Alm P, Andersson KE. (2000a). Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J Urol*, 164, 868-875.
- Hedlund P, Aszodi A, Pfeifer A, Alm P, Hofmann F, Ahmad M, Fassler R, Andersson KE. (2000b). Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 2349-2354.
- Heppner TJ, Bonev AD, Nelson MT. (1997). Ca^{2+} -activated K^{+} channels regulate action potential repolarization in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol*, 273, C110-C117.
- Herrera GM, Heppner TJ, Nelson MT. (2000). Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279, R60-R68.
- Herrera GM, Heppner TJ, Nelson MT. (2001). Voltage dependence of the coupling of Ca^{2+} sparks to BK(Ca) channels in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280 (3), C481-C490.
- Herrera GM, Pozo MJ, Zvara P, Adelman JP, Nelson MT. (2002). SK3 channels regulate urinary bladder smooth muscle (UBSM) function in vivo. *FASEB J*. 16, A387.
- Herrera GM, Pozo MJ, Zvara P, Petkov GV, Bond CT, Adelman JP, Nelson MT. (2003). Urinary bladder instability induced by selective suppression of the murine small conductance calcium activated potassium (SK3) channel. *J Physiol*, 551, 893-903.

Bibliografia

- Herrera GM, Etherton B, Nausch B, Nelson MT. (2005). Negative feedback regulation of nerve-mediated contractions by K_{Ca} channels in mouse urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol*, 289, R402-R409.
- Hetman JM, Robas N, Baxendale R, Fidock M, Phillips SC, Soderling SH, Beavo JA. (2000). Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12891–12895.
- Hewawasam P, Erway M, Thalody G, Weiner H, Boissard CG, Gribkoff VK, Meanwell NA, Lodge N, Starrett JE Jr. (2002). The synthesis and structure-activity relationships of 1,3-diaryl 1,2,4-(4H)-triazol-5-ones: a new class of calcium-dependent, large conductance, potassium (maxi-K) channel opener targeted for urge urinary incontinence. *Bioorg Med Chem Lett*.12 (7), 1117-1120.
- Hewawasam P, Fan W, Cook DA, Newberry KS, Boissard CG, Gribkoff VK, Starrett J, Lodge NJ. (2004). 4-Aryl-3-(mercapto)quinolin-2-ones: novel maxi-K channel opening relaxants of corporal smooth muscle. *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 4479-4482.
- Hristov KL, Cui X, Brown SM, Liu L, Kellett WF, Petkov GV.(2008). Stimulation of beta3-adrenoceptors relaxes rat urinary bladder smooth muscle via activation of the large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295 (5), C1344-C1353.
- Hristov KL, Chen M, Kellet WF, Rovner ES, Petkov GV. (2011). Large-conductance voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels regulate human detrusor smooth muscle function. *Am J Physiol Cell Physiol*, 301, C903-C912.
- Hobbs AJ. (1997). Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci*, 18, 484-491.
- Holland M, Langton PD, Standen NB, Boyle JP. (1996). Effects of the BKCa channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle. *Br J Pharmacol* 117, 119-129.
- Holmquist F, Hedlund H, Andersson KE. (1991a). L-NG-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum. *Acta Physiol Scand*, 141, 441-442.
- Holmquist F, Stief CG, Jonas U, Andersson KE (1991b). Effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine on the erectile response to cavernous nerve stimulation in the rabbit. *Acta Physiol Scand*, 143, 299-304.
- Howe BB, Halterman TJ, Yochim CL, Do ML, Pettinger SJ, Stow RB, Ohnmacht CJ, Russell K, Empfield JR, Trainor DA, Brown FK, Kau ST. (1995). ZENCA ZD6169: a novel KATP channel opener with in vivo selectivity for urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther*. 274 (2), 884-890.
- Hristov KL,Parajuli SP,Soder RP,Cheng Q, Rovner ES,Petkov GV. (2012). Suppression of human detrusor smooth muscle excitability and contractility via pharmacological activation of large conductance Ca²⁺-activated K_p channels. *Am. J.Physiol.CellPhysiol*, 302, C1632–C1641.
- Hu S, Kim HS, Savage P, Jeng AY.(1997). Activation of BK(Ca) channel via endothelin ET(A) receptors in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.*, 324 (2-3), 277-282.
- Huang Y, Lau CW, Ho IH. (1997). NS 1619 activates Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat vas deferens. *Eur J Pharmacol*.325 (1), 21-27.
- Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarty JL, Snyder SH, Burnett AL. (2002). Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 4061-4066.
- Igawa Y, Mattiasson A, Andersson KE. (1992). Is bladder hyperactivity due to outlet obstruction in the rat related to changes in reflexes or to myogenic changes in the detrusor? *Acta Physiol Scand*. 146 (3), 409-411

Bibliografia

Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. (1990). Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 170, 843-850.

Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 11059-11063.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 49, 1939-1945.

Inoue S, Saito M, Takenaka A (2012). Hydroxyfasudil ameliorates bladder dysfunction in male spontaneously hypertensive rats. *Urology*, 79 (5), 1186

Insuk SO, Chae MR, Choi JW, Yang DK, Sim, JH, Lee SW. (2003). Molecular basis and characteristics of KATP channel in human corporal smooth muscle cells. *Int J Impot Res*, 15, 258-266.

Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J. (1997a). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 11651-11656.

Ishii TM, Maylie J, Adelman JP. (1997b). Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *J Biol Chem*, 272 (37), 23195-23200.

Jamshidi R, Moore A, Park A, et al. (2011). Reference Guide for Clinicians: Diagnosis and Management of Overactive Bladder. Washington, DC; Association of Reproductive Health Professionals; <http://www.arhp.org/uploadDocs/OABQRG.pdf>.

Jensen BS, Strobaek D, Christophersen P, Jorgensen TD, Hansen C, Silahatoglu A, Olesen SP, Ahring PK. (1998) Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Am J Physiol*, 275 (3 Pt 1):C848-C856.

Jensen BS, Strøbaek D, Olesen SP, Christophersen P. (2001). The Ca²⁺-Activated K⁺ channel of Intermediate Conductance: A Molecular Target for Novel Treatments? *Curr Drug Targets*, 2 (4), 401-422.

Jensen BS, Hertz M, Christophersen P, Madsen LS. (2002). The Ca²⁺-activated channel of intermediate conductance: a possible target for immune suppression. *Expert Opin Ther Targets*, 6 (6), 626-636.

Jeremy JY, Morgan RJ, Mikhailidis DP, Dandona P. (1986). Prostacyclin synthesis by the corpora cavernosa of the human penis: evidence for muscarinic control and pathological implications. *Prostaglandins Leukot Med*, 23, 211-216.

Jesmin S, Zaedi S, Yamaguchi N, Maeda S, Yamaguchi I, Goto K, Miyauchi T. (2006). Effects of dual endothelin receptor antagonist on antiapoptotic marker Bcl-2 expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Biol Med*, 231:1034-1039.

Jin L, Burnett AL. (2008). NADPH oxidase: recent evidence for its role in erectile dysfunction. *Asian J Androl*, 10, 6-13.

Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, McKinlay JB. (2000). Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Urol*, 163(2), 460-463.

Bibliografia

- Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, Kackmarek LK. (1997). hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 11013-11018.
- Junemann KP, Aufenanger J, Konrad T, Pill J, Berle B, Junemann CP, Alken P. (1991). The effect of impaired lipid metabolism on the smooth muscle cells of rabbits. *Urol Res*, 19, 271-275.
- Kaczorowski GJ, Knaus HG, Leonard RJ, Mc Manus OB, Garcia ML. (1996). High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J Bioenerg Biomembr*, 28, 255-265.
- Kakizaki H, de Groat VC. (1996). Role of spinal nitric oxide in the facilitation of the micturition reflex by bladder irritation. *J Urol*, 155, 355-360.
- Kalsi JS, Kell PD, Celtek S, Ralph DJ (2004). NCX-911, a novel nitric oxide-releasing PDE5 inhibitor relaxes rabbit corpus cavernosum in the absence of endogenous nitric oxide. *Int J Impot Res*, 16, 195-200.
- Kang KK, Yu JY, Yoo M, Kwon JW. (2005). The effect of DA-8159, a novel PDE5 inhibitor, on erectile function in the rat model of hypercholesterolemic erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 17 (5), 409-416.
- Kapoor D, Aldred H, Clark S, Channer KS, Jones TH. (2007). Clinical and biochemical assessment of hypogonadism in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 30, 911-917.
- Kaya C, Uslu Z, Karaman I. (2006). Is endothelial function impaired in erectile dysfunction patients? *International Journal of Impotence Research*. 18, 55-60.
- Kedia GT, Uckert S, Jonas U, Kuczyk MA, Burchardt M. (2008) The nitric oxide pathway in the human prostate: clinical implications in men with lower urinary tract symptoms. *World J Urol*, 26(6), 603-609.
- Keegan A, Cotter MA, Cameron NE.(1999). Effects of diabetes and treatment with the antioxidant alpha-lipoic acid on endothelial and neurogenic responses of corpus cavernosum in rats. *Diabetologia*, 42, 343-450.
- Keegan A, Cotter MA, Cameron NE.(2001). Corpus cavernosum dysfunction in diabetic rats: effects of combined alpha lipoic acid and gamma-linolenic acid treatment. *Diabetes Metab Res Rev*, 17, 380-386.
- Keilbach A, Ruth P, Hofmann F. (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, 208, 467-473.
- Khan MA, Thompson CS, Jeremy JY, Mumtaz P, Mikhailidis P, Morgan RJ.(2001). The effect of superoxide dismutase on nitric oxide-mediated and electrical field-stimulated diabetic rabbit cavernosal smooth muscle relaxation. *BJU Int*, 87, 98-103.
- Khanna R, Chang MC, Joiner WJ, Kaczmarek LK, Schlichter LC. (1999). hSK4/hIK1, a calmodulin –binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem*, 274, 14838-14849.
- Khawaled R, Bruening-Wright A, Adelman JP, Maylie J. (1999). Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium channels. *Pflugers Arch*, 438 (3), 314-332.
- Kohler R, Degenhardt C, Kuhn M, Runkel N, Paul M, Hoyer J. (2000). Expression and function of endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in human mesenteric artery. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. *Circ Res*, 87, 496-503.
- Khullar V, Amarenco G, Angulo JC, et al. (2013). Efficacy and tolerability of mirabegron, a $\beta(3)$ -adrenoceptor agonist, in patients with overactive bladder: results from a randomised European-Australian phase 3 trial. *Eur Urol*, 63 (2), 283-295.

Bibliografía

- Kim N, Azadzi KM, Goldstein I, Saenz de Tejada I. (1991). A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J Clin Invest*, 88, 112-118.
- Kim N, Vardy, Padmz-Nathan H, Daley J, Golstein I, Saénz de Tejada I. (1993). Oxygen tension regulates the oxide pathway. Physiological role in penile erection. *J Clin Invest*, 91, 437-442.
- Kim NN, Huang Y, Moreland RB, Kwak SS, Goldstein I, Traish A. (2000). Cross-regulation of intracellular cGMP and cAMP in cultured human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Mol Cell Biol Res Commun*, 4 (1), 10-14.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K.(1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273 (5272), 245-248.
- King HK, Aubert RE, Herman WH. (1998). Global burden of diabetes. Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, 21, 1414-1431.
- Klein R, Klein BE, Lee KE, Moss SE, Cruickshanks KJ. (1996). Prevalence of self-reported erectile dysfunction in people with long-term IDDM. *Diabetes Care* 19, 135-141.
- Klotz T, Bloch W, Zimmermann J, Ruth P, Engelmann U, Addicks K. (2000). Soluble guanylate cyclase and cGMP-dependent protein kinase I expression in the human corpus cavernosum. *Int J Impot Res*, 12 (3), 157-164.
- Knaus HG, Eberhart A, Glossmann H, Munujos P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. (1994). Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels. *Cell Signal*, 6, 861-870.
- Knaus HG, Schwarzer C, Koch RO, EberhartA, Kaczorowski GJ, Glossmann H, Wunder F, Pongs O, Garcia ML, Sperk G. (1996). Distribution of high-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J Neurosci*, 16, 955-963.
- Kobayashi H, Adachi-Akahane S, Nagao T. (2000). Involvement of BK(Ca) channels in the relaxation of detrusor muscle via beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, 404, 231-238.
- Koh SD, Bradley KK, Rae MG, Keef KD, Horowitz B, Sanders KM. (1998). Basal activation of ATP-sensitive potassium channels in murine colonic smooth muscle cell. *Biophys J*, 75, 1793–1800.
- Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP. (1996). Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*, 273 (5282), 1709-1714.
- Kolodny RC, Kahn CB, Goldstein HH, Barnett DM. (1974). Sexual dysfunction in diabetic men. *Diabetes* 23, 306-309.
- Konishi M, Su C. (1983). Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* 1983, 5, 881-886.
- Korovkina VP, Brainard AM, Ismail P, Schmidt TJ, England SK. (2004). Estradiol binding to maxi-K channels induces their down-regulation via proteasomal degradation. *J Biol Chem* 279, 1217-1223.
- Kotera J, Fujishige K, Yuasa K, Omori K. (1999). Characterization and phosphorylation of PDE10A2, a novel alternative splice variant of human phosphodiesterase that hydrolyzes cAMP and cGMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 261, 551–557.
- Kovanecz I, Nolzco G, Ferrini MG, Toblli JE, Heydarkhan S, Vernet D et al.(2009). Early onset of fibrosis within the arterial media in a rat model of type 2 diabetes mellitus with erectile dysfunction. *BJU Int*, 103, 1396-1404.

Bibliografia

- Koya D, King GL. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47, 859-866.
- Kun A, Martínez AC, Tanko LB, Pataricza J, Papp JG, Simonsen U. (2003). Ca^{2+} -activated K^{+} channels in the endothelial cell layer involved in modulation of neurogenic contractions in rat penile arteries. *Eur J Pharmacol*, 474, 103-115.
- Kun A, Kiraly I, Pataricza J, Marton Z, Krassoi I, Varro A, Simonsen U, Papp JG, Pajor L. (2008). C-type natriuretic peptide hyperpolarizes and relaxes human penile resistance arteries. *J Sex Med*, 5 (5), 1114-1125.
- Kun A, Matchkov VV, Stankevicius E, Nardi A, Hughes AD, Kirkeby HJ et al. (2009). NS11021, a novel opener of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, enhances erectile responses in rats. *Br J Pharmacol* 158: 1465-1476.
- Kütke A, Wiedenroth A, Magert HJ, Uckert S, Forssmann WG, Stief CG, Jonas U. (2001). Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle. *J Urol*, 165, 280-283.
- Lau DH, Kommu S, Mumtaz FH, Morgan RJ, Thompson CS, Mikhailidis DP. (2006). The management of phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitor failure. *Curr Vasc Pharmacol*, 4 (2), 89-93.
- Lau LC, Adaikan PG. (2007). Effect of sildenafil and rolipram on adrenergic responses in isolated human and monkey corpus cavernosum. *Eur Urol*, 52 (1), 253-258.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. (2006). Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology (Bethesda)*, 21, 69-78.
- Lee HC, Cai JJ, Yu H. (1994). Effect of protein kinase C on cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent phosphodiesterase in hypertrophic cardiomyopathic hamster hearts. *J Pharmacol Exp Ther*, 270 (3), 1171-1176.
- Lee SW, Wang HZ, Zhao W, Ney P, Brink PR, Christ GJ. (1999). Prostaglandin E1 activates the large-conductance KCa channel in human corporal smooth muscle cells. *Int J Impot Res*, 1, 189-199.
- Lee SW, Kang TM. (2001). Effects of nitric oxide on the Ca^{2+} -activated potassium channels in smooth muscle cells of the human corpus cavernosum. *Urol Res*, 29, 359-365.
- Lee TA, Bamberger M, Ellsworth P. (2013). Impact of mirabegron extended-release of the treatment of overactive bladder with urge urinary incontinence, urgency and frequency. *Res Rep Urol*, 5, 147-157.
- Leone AM, Wiklund NP, Hokfelt T, Brundin L, Moncada S. (1994). Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. *Neuroreport*, 5, 733-736.
- Levin RM, Hypolite J, Longhurst PA, Wein AJ. (1991). Comparison of the contractile and metabolic effects of muscarinic stimulation with those of KCl. *Pharmacology*, 42 (3), 142-150.
- Levin RM, Wein AJ, Saito M, Longhurst PA. (1995). Factors that modulate the initiation of micturition. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 175, 3-10.
- Lewis RW, Fugl-Meyer KS, Corona G, Hayes RD, Laumann EO, Moreira ED Jr., Rellini AH, and Segraves T. (2010). Definitions/Epidemiology/Risk Factors for Sexual Dysfunction. *J Sex Med*, 7, 1598-1607.
- Li G, Cheung DW. (1999). Effects of Paxilline on K^{+} channels in rat mesenteric arterial cells. *Eur J Pharmacol*, 372, 103-107.

Bibliografía

- Li WJ, Park K, Paick JS, Kim SW. (2011). Chronic treatment with an oral Rho-kinase inhibitor restores erectile function by suppressing corporal apoptosis in diabetic rats. *J Sex Med*, 8 (2), 400-410.
- Lin CS, Xin ZC, Lin G, Lue TF. (2003). Phosphodiesterases as therapeutic targets. *Urology*, 61, 685-691.
- Liu P, Xi Q, Ahmed A, Jaggar JH, Dopico AM. (2004). Essential role for smooth muscle BK channels in alcohol-induced cerebrovascular constriction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 18217-18222.
- Logsdon NJ, Kang J, Togo JA, Christian EP, Aiyar J. (1997). A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, 272, 32723-32726.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*, 22, 307-312.
- Loughney K, Taylor J, Florio Va. (2005). 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: localization in human tissues. *Int J Import Res*, 17 (4), 320-325.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- Lu L, Montrose-Rafizadeh M, Guggino WB. (1990). Ca²⁺-activated K⁺ channels from rabbit kidney medullary thick ascending limb cells expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 265 (27), 16190-16194.
- Lunardi CN, Vercesi JA, da Silva RS, Bendhack LM. (2007). Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)(2)(NO)](PF₆) is due to activation of K(Ca) by a cGMP-dependent pathway. *Vascul Pharmacol*, 47 (2-3), 139-144.
- Macmillan S, Sheridan RD, Chilvers ER, Patmore L. (1995). A comparison of the effects of SCA40, NS 004 and NS 1619 on large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in bovine tracheal smooth muscle cells in culture. *Br J Pharmacol*. 116 (1), 1656-1660.
- Maher AD, Kuchel PV. (2003). The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, 1182-1197.
- Malysz J, Buckner SA, Daza AV, Milicic I, Perez-Medrano A, Gopalakrishnan M. (2004). Functional characterization of large conductance calcium-activated K⁺ channel openers in bladder and vascular smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, 481-489.
- Giuseppe Mancina, Guido Grassi, Cristina Giannattasio, Gino Seravalle.(1999). Sympathetic Activation in the Pathogenesis of Hypertension and Progression of Organ Damage. *Hypertension*, 34 (part2), 724-728.
- Manganiello VC, Taira M, Degerman E, Belfrage P. (1995). Type III cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE-3 gene family). *Cell Signal*, 7 (5), 445-455.
- Mannino DM, Klevens RM, Flanders WD. (1994). Cigarette smoking: an independent risk factor for impotence? *Am J Epidemiol*. 140(11), 1003-1008.
- Martin-Morales A, Sanchez-Cruz JJ, Saenz de Tejada I, Rodriguez-Vela L, Jimenez-Cruz JF, Burgos-Rodriguez R. (2001). Prevalence and independent risk factors for erectile dysfunction in Spain: results of the Epidemiologia de la Disfuncion Erectil Masculina study. *J Urol*, 166, 569-574.
- Martínez-Salamanca JI, La Fuente JM, Cardoso J, Fernández A, Cuevas P, Wright HM, Angulo J. (2014). Nevibolol potentiates the efficacy of PDE5 inhibitors to relax corpus cavernosum and penile arteries from diabetic patients by enhancing the NO/CGMO pathway. *J Sex Med*, 11 (5), 1182-1192

Bibliografía

- Martínez-Salamaca JI, Espinós EL, Moncada I, Portillo LD, Carballido J. (2015). Management of end-stage erectile dysfunction and stress urinary incontinence after radical prostatectomy by simultaneous dual implantation using a single trans-scrotal incision: surgical technique and outcomes. *Asian J Androl*, 17 (5), 792–796.
- Mass R, Schwedhelm E, Albsmeier J, Boger R. (2002). The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vascular Medicine*, 7, 213-225.
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. (2000). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest*, 106, 1521-1530.
- Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, Takeshita A. (2002). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 909-913.
- Matoba T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Kunihiro I, Urakami-Harasawa L, Mukai Y, Hirakawa Y, Akaike T, Takeshita A. (2003). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1224-1230.
- Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. (2003). Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res*, 39 (4), 67-86.
- McCulloch DK, Campbell IW, Wu FC, Prescott RJ, Clarke BF. (1980) The prevalence of diabetic impotence. *Diabetologia*, 18, 279-283, 1980.
- McDevitt M A, Thorsness RJ, Levine JE (2009). A role for ATP-sensitive potassium channels in male sexual behavior. *Horm Behav*, 55, 366–374.
- Macfarlane GJ, Botto H, Sagnier PP, Teillac P, Richard F, Boyle P. (1996). The relationship between sexual life and urinary condition in the French community. *J Clin Epidemiol*, 49, 1171–1176.
- Mc Vary KT, Carrier S, Wessells H. (2001). Smoking and erectile dysfunction: evidence based analysis. *J Urol*, 166, 624-1632.
- Mc Vary KT (2005). Erectile dysfunction and lower urinary tract symptoms secondary to BPH. *Eur urol*, 47, 838-845.
- Mc Vary KY, Podlasek CA, McKenna KE, Wood D. (2006). Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are employed in neuropathic and diabetic models of erectile dysfunction.3 (suppl.1), 45.
- Mc Vary KT, Morning W, Camps Jr JL, Young JM, Tseng LJ. , Van Den Eeden G. (2007). Sildenafil citrate improves erectile function and urinary symptoms in men with erectile dysfunction and lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia: a randomized double-blind trial. *J Urol*, 177, 1071-1077.
- Mc Veigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes JR. (1992). Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 35 (8), 771-776.
- Melman A, Zhao W, Davies KP, Bakal R, Christ GJ. (2003). The successful long-term treatment of age-related erectile dysfunction with hSlo cDNA in rats in vivo. *J Urol*, 170, 285-290.
- Melman A, Bar-Chama N, McCullough A, Davies K, Christ G. (2005). The first human trial for gene transfer therapy for the treatment of erectile dysfunction: preliminary results. *Eur Urol*, 48 (2), 314-318.
- Melman A, Bar-Chama N, McCullough A, Davies K, Christ G. (2006). hMaxi-K gene transfer in males with erectile dysfunction: results of the first human trial. *Hum Gene Ther*, 17(12), 1165-1176.

Bibliografia

- Melman A, Rojas L, Christ G. (2009). Gene transfer for erectile dysfunction: will this novel therapy be accepted by urologists? *Curr Opin Urol*, 19 (6), 595-600.
- Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT, Aldrich RW (2004). Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *J Biol Chem* 279, 36746–36752.
- Mersdorf A, Goldsmith PC, Diederichs W, Padula CA, Lue TF, Fishman IJ, Tanagho EA. (1991). Ultrastructural changes in impotent penile tissue: a comparison of 65 patients. *J Urol*, 145, 749-758.
- Metz P, Ebbehøj J, Uhrenholdt A, Wagner G. (1983). Peyronie's disease and erectile failure. *J Urol*, 130, 1103-1104.
- Meuleman EJ. (1990). The role of penile biopsies in the evaluation of erectile dysfunction: a histo-morphometric study of the human cavernous body. *Int J Impotence Res*, 2 (Suppl 2): 230.
- Meuleman EJ, Wijkstra H, Doesburg WH, Debruyne FM. (1991). Comparison of the diagnostic value of pump and gravity cavernosometry in the evaluation of the cavernous veno-occlusive mechanism. *J Urol*, 146 (5):1266-1270.
- Michal V, Ruzbarsky V. (1980) Histological changes in the penile arterial bed with aging and diabetes. In: A. Zornio, G. Rossi (Eds). *Vasculogenic Impotence: Proceedings of the First International Conference on Corpus Cavernosum Revascularization*. Edited Charles C Thomas Springfield (IL) , pp. 113–119.
- Michel MC, Vrydag W. (2006). α 1-, α 2- and β -adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol*, S88-S119.
- Miller C, Moczyldowsky E, Latorre R, Phillips M. (1985). Charibdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^{+} channel from mammalian skeletal muscle. *Nature*, 313, 316-318.
- Milsom I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thueroff J, Wein AJ.(2001). How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU International*, 87, 760-766.
- Mirone V, Imbimbo C, Bortolotti A, Di Cintio E, Colli E, Landoni M, Lavezzari M, Parazzini F. (2002). Cigarette smoking as risk factor for erectile dysfunction: Results from an Italian epidemiological study. *Eur Urol*, 41, 294–297.
- Mitsui T, Kakizaki H, Matsuura S, Ameda K, Yoshioka M, Koyanagi T. (2001). Afferent fibers of the hypogastric nerves are involved in the facilitating effects of chemical bladder irritation in rats. *J Neurophysiol*. 86(5): 2276-84.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-142.
- Moncada S, Higgs EA. (1995). Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J*, 9, 1319-1330.
- Moncada S, Higgs EA, Furchgott RF. (1997). International Union of Pharmacology. Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev*, 49, 137-142.
- Mongan LC, Hill MJ, Chen MX, Tate SN, Collins SD, Buckby L, Grubb BD. (2005). The distribution of small and intermediate conductance calcium-activated potassium channels in the rat sensory nervous system. *Neuroscience*, 131 (1), 161-175.
- Montorsi F, Corbin JD, Phillips S. (2004). Review of phosphodiesterases in the urogenital system: New directions for therapeutic intervention. *J Sex Med*, 1, 322-336.

Bibliografía

- Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, Salonia A, Briganti A, Werba JP, Montorsi F. (2006). Association between erectile dysfunction and coronary artery disease: Matching the right target with the right test in the right patient. *Eur Urol*, 50 (4), 721-731.
- Mora TC, Suarez-Kurtz G. (2005). Effects of NS1608, a BK(Ca) channel agonist, on the contractility of guinea-pig urinary bladder in vitro. *Br J Pharmacol*, 144, 636-641.
- Morano S. (2003). Pathophysiology of diabetic sexual dysfunction. *J Endocrinol Invest*, 26, 65–9.
- Morano S, Mandosi E, Fallarino M, Gatti A, Tiberti C, Sensi M y col., (2007). Antioxidant treatment associated with sildenafil reduces monocyte activation and markers of endothelial damage in patients with diabetic erectile dysfunction: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur Urol*, 52:1768-1774.
- Moreira EDJr, Lisboa Lobo CF, Villa M, Nicolosi A, Glasser DB. (2002). Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Salvador, northeastern Brazil: a population-based study. *Int J Impot Res*, 14 (suppl 2), S3–S9.
- Moreland RB, Traish A, McMillin MA, Smith Goldstein, Saenz de Tejada I. (1995). PGE1 suppresses the induction of collagen síntesis by transforming growth factor-beta 1 in human corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol*, 153:826
- Moreland RB, Albadawi H, Bratton C, Patton G, Goldstein I, Traish A, Watkins MT. (2001). O2-dependent prostanoid synthesis activates PGE receptors on corpus cavernosum smooth muscle. *Am J Physiol*, 281, H552-H558.
- Moreland R, Brioni JD, Sullivan JP. (2004). Emerging pharmacologic approaches for the treatment of lower urinary tract disorders. *J Pharmacol Exp Ther*, 308, 797–804.
- Mouli S, McVary KT. (2006). PDE5 inhibitors for LUTS. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 12, 316-324.
- Muirhead GJ, Rance DJ, Walker DK, Wastall P. (2002). Comparative human pharmacokinetics and metabolism of single-dose oral and intravenous sildenafil. *Br J Clin Pharmacol*. 53 (Suppl 1), 13S-20S.
- Mulvany MJ, Halpern W. (1977). Contractile properties of small resistance arteries in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Cir Res*, 41, 19-26.
- Mulvany MJ. (2000). Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 4, 49.
- Müller SC, el-Damanhoury H, Rüth J, Lue TF. (1991). Hypertension and impotence. *Eur Urol*, 19 (1), 29-34.
- Münzel T, Feil R, Mülsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U. (2003). Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation*, 108 (18), 2172-2183.
- Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. (2005). Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMPdependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1551–1557.
- Nagao K, Miura K. (1996). Regulation of male sexual function. *Nippon Rinsho* 1997; 55:2849-54; Hackin, GJ. Diabetic sexual dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25, 379-400.
- Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. (2003). Protein kinase C β inhibition and aorta and corpus cavernosum function in streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol*, 475, 99-106.
- Nardi A, Olesen SP (2008). BK channel modulators: a comprehensive overview. *Curr Med Chem*, 15, 1126–1146.

Bibliografia

Nehra A, Azadzo KM, Moreland RB, et al. (1998). Cavernosal expandability is an erectile tissue mechanical property which predicts trabecular histology in an animal model of vasculogenic erectile dysfunction. *J Urol*, 159:2229.

Nehra A, Gettman MT, Nugent M, y col. (1999). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) is sufficient to induce fibrosis of rabbit corpus cavernosum in vivo. *J Urol* 1999; 162:910)

Nehra A. (2009). Erectile Dysfunction and Cardiovascular Disease: Efficacy and Safety of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors in Men With Both Conditions *Mayo Clin Proc*, 4 (2), 39–148.

Nelli S, Wilson W, Laidlaw H, Llano A, middleton S, Price A, Martin W. (2003). Evaluation of potassium ions as the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the bovine coronary arterie. *Br J Pharmacol*, 139, 982-988.

Nishimaru K, Eghbali M, Lu R, Marijic J, Stefani E, Toro L. (2004). Functional and molecular evidence of MaxiK channel $\beta 1$ subunit decrease with coronary artery ageing in the rat. *J Physiol*, 559, 849-862.

Noma A. (1983) ATP-regulated K1 channels in cardiac muscle. *Nature*, 305, 147–148.

Norman RA, Dzielak DJ. (1986). Immunological dysfunction and enhanced sympathetic activity contribute to the pathogenesis of spontaneous hypertension. *J Hypertens*, 3 (Suppl.4), S437-S439.

Oger S, Behr-Roussel D, Gorny D, Bernabé J, Comperat E, Chartier-Kastler E, Denys P, Giuliano F. (2011). Effects of potassium channel modulators on myogenic spontaneous phasic contractile eactivity in human detrusor from neurogenic patients. *BJU Int*, 108,604–611.

Ohi Y, Atsuki K, Tori Y, Ohizumi Y, Watanabe M, Imaizumi Y. (2001a). Imaging of Ca^{2+} release by caffeine and 9-methyl-7-bromoeudistomin D and the associated activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in urinary bladder smooth muscle cells of the guinea pig. *Jpn J Pharmacol*, 85, 382-390.

Ohi Y, Yamamura H, Nagano N, Ohya S, Muraki K, Watanabe M, Imaizumi Y. (2001b). Local (Ca^{2+}) transients and distribution of BK channels and ryanodine receptors in smooth muscle cells of guinea-pig vas deferens and urinary bladder. *J Physiol*, 534, 313-326.

Ohya S, Kimura S, KitsukawaM, Muraki K, Watanabe M, Imaizumi Y. (2000). SK4 encodes intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in mouse urinary bladder smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol*, 84, 97-100.

Okabe H, Hale TM, Kumon H, y col., (1999). The penis is not protected--in hypertension there are vascular changes in the penis which are similar to those in other vascular beds. *Int J Impot Res*, 11, 133.

Olensen SP, Munch E, Moldt P, Drejer J. (1994). Selective activation of Ca^{2+} -dependent K^{+} channels by novel benzimidazolone. *Eur J Pharmacol* 251, 53-59.

O'Neill WC, Steinberg DF. (1995). Functional coupling of Na^{+} - K^{+} -2Cl⁻ cotransport and Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in vascular endothelial cells. *Am J Physiol*, 269 (1 Pt 1), C267-C274

Otsuka A, Shinbo H, Matsumoto R,y col.,(2008). Expression and functional role of β -adrenoceptors in the human urinary bladder urothelium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 377,473-481.

Ottesen B, Wagner G, Virag R, Fahrenkrug J. (1984). Penile erection: Possible role for vasoactive intestinal polypeptide as a neurotransmitter. *Br Med J*, 288 (6410), 9-11.

Bibliografía

- Padma-Nathan H.(1988). Neurologic evaluation of eréctil dysfunction. *Urol Clin North Am*, 15, 77. Pandita RK, Andersson KE. (1999). J Urol. Effects of intravesical administration of the K⁺ channel opener, ZD6169, in conscious rats with and without bladder outflow obstruction. *J Urol*, 162 (3 Pt 1), 943-948.
- Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA.(2000). Transient hypertension directly impairs endothelium dependent vasodilation of the human microvasculature. *Hypertension.*, 36 (6), 941-944.
- Papoutsis I, Nikolaou P, Athanaselis S, Alevizopoulos G, Pistos C, Paraskevopoulou C, Spiliopoulou C. (2011). Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometric method for the determination of sildenafil and desmethyl-sildenafil in whole blood. *J Sep Sci*, 34 (21), 3037-3342.
- Parajuli SP, Soder RP, Hristov KL, Petkov GV. (2012). Pharmacological activation of small conductance calcium-activated potassium channels with naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine decreases guinea pig detrusor smooth muscle excitability and contractility. *J Pharmacol Exp Ther.* 340 (1), 114-123.
- Parajuli SP, Hristov KL, Soder RP, Kellett WF, Petkov GV. (2013) .NS309 decreases rat detrusor smooth muscle membrane potential and phasic contractions by activating SK3 channels.*Br.J.Pharmacol.*168,1611–1625.
- Parihar AS, Coghlan MJ, Gopalakrishnan M, Shieh CC (2003a). Effects of intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *Eur J Pharmacol*, 471, 157–164.
- Parihar AS, Groebe DR, Scott VE, Feng J, Zhang XF, Warrior U y col.,(2003b). Functional analysis of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: ion flux studies by atomic absorption spectrometry. *Assay Drug Dev Technol*, 1, 647–654.
- Pedarzani P, D'hoedt D, Doorty KB, Wadsworth JD, Joseph JS, Jeyaseelan K, Kini RM, Gadre SV, Sapatnekar SM, Stocker M, Strong PN. (2002). Tamapin, a venom peptide from the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) that targets small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and afterhyperpolarization currents in central neurons. *J Biol Chem*, 277(48), 46101-46109
- Pegge NC, Twomey AM, Vaughton K, Gravenor MB, Ramsey MW, Price DE.(2006). The role of endothelial dysfunction in the pathophysiology of erectile dysfunction in diabetes and in determining response to treatment. *Diabet Med*, 23, 873-878.
- Pennefather P, Lancaster B, Adams PR, Nicoll RA. (1985). Two distinct Ca-dependent potassium currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82, 3040-3044.
- Petkov GV, Bonev AD, Heppner TJ, Brenner R, Aldrich RW,Nelson MT. (2001). β 1-subunit of the Ca²⁺-activated K⁺ channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle. *J Physiol*, 537, 443-452.
- Petkov GV, Nelson MT. (2005). Differential regulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by beta-adrenoceptors in guinea pig urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288, C1255-C1263.
- Petkov, G.V. (2012). Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. *Nat. Rev. Urol.* 9 (1), 30-40.
- Pickard RS, Powell PH, Zar MA. (1991). The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 104, 755-759.
- Pickard RS, King P, Zar MA y col(1994).. Corpus cavernosal relaxation in impotent men. *Br J Urol*, 74:485.
- Pieper GM, Moore-Hilton G, Roza AM.(1996). Evaluation of the mechanism of endothelial dysfunction in the genetically-diabetic BB rat. *Life Sci*, 58:PL147–PL152.

Bibliografía

- Podlasek CA, Zelner DJ, Bervig TR, Gonzalez CM, McKenna KE, McVary KT. (2001). Characterization and localization of nitric oxide synthase isoforms in the BB/WOR diabetic rat. *J Urol*, 166:746-755.
- Prieto D, Rivera L, Benedito S, Recio P, Villalba N, Hernandez M y col., (2006). Ca^{2+} -activated K^{+} (KCa) channels are involved in the relaxation elicited by sildenafil in penile resistance arteries. *Eur J Pharmacol* 531: 232–237.
- Qiu Y, Kraft P, Lombardi E, Clancy J. (2000). Rabbit corpus cavernosum smooth muscle shows a different phosphodiesterase profile than human corpus cavernosum. *J Urol*, 164, 882-886.
- Quayle JM, Standen NB. (1994). KATP channels in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*, 28, 797–804.
- Rae JL, Shepard AR. (1998). Molecular biology and electrophysiology of calcium-activated potassium channels from lens epithelium. *Curr Eye Res*, 17(3), 264-275.
- Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Bruce BA, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. (1996). Angiotensin II-mediated Hypertension in the Rat Increases Vascular Superoxide Production via Membrane NADH/NADPH Oxidase Activation. Contribution to Alterations of Vasomotor Tone. *J Clin Invest*, 97, 1916-1923.
- Rajasekaran M, Wilkes N, Kuntz S, E Albo M. (2005). Rho-kinase inhibition suppresses bladder hyperactivity in spontaneously hypertensive rats. *Neurourol Urodyn*, 24 (3), 295-300.
- Rajfer J, Rosciszewski A, Mehninger M. (1988). Prevalence of corporeal venous leakage in impotent men. *J Urol*, 140, 69.
- Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. (1992). Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *New Engl J Med*, 326, 90-94.
- Randall MD, Kendall DA. (1998). Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. *Eur J Pharmacol*, 346 (1), 51-53.
- Rahman NU, Phonsombat S, Bochinski D, Carrion RE, Nunes L, Lue TF. (2007). An animal model to study lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction: the hyperlipidaemic rat. *BJU Int*, 100 (3), 658-663.
- Randall MD. (2003). A new endothelial target for cannabinoids. *Mol Pharmacol*, 63 (3), 469-470.
- Ratz PH, Meehl JT, Eddinger TJ. (2002). Rho A kinase and protein kinase C participate in regulation of rabbit stomach fundus smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol*, 137 (7), 983-992.
- Reaven GM. (1988). Banting lecture: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37, 1595–1607.
- Rehman J, Chenven E, Brink P, Peterson B, Walcott B, Wen YP, Melman A, and Christ G. (1997). Diminished neurogenic but not pharmacological erections in the 2- to 3-month experimentally diabetic F-344 rat. *Am J Physiol*, 272, H 1960-H1971.
- Rendell MS, Rajfer J, Wicker PA, Smith MD. (1999). Sildenafil for treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a randomized controlled trial. Sildenafil Diabetes Study Group. *JAMA*, 281, 421-426.
- Rahman NU, Phonsombat S, Bochinski D, Carrion RE, Nunes L, Lue TF. (2007). An animal model to study lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction: the hyperlipidaemic rat. *BJU Int*, 100 (3), 658-663.
- Richardson D, Vinik A. (2002). Etiology and treatment of erectile failure in diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*, 2, 501-509.

Bibliografía

- Ro S, Hatton WJ, Koh SD, Horowitz B. (2001). Molecular properties of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels expressed in murine colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G964-G973.
- Robins D, Cadorzo L. (2010). New Drug Treatments for Urinary Incontinence. *Maturitas* 65(4), 340-347.
- Roehrborn CG and McConnell JD (2002). : Etiology, pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Campbell's Urology*. WB Saunders Co chap 38, p1297-1336.)
- Roehrborn CG. (2004). Lower urinary tract symptoms, benign prostatic hyperplasia, erectile dysfunction, and phosphodiesterase-5 inhibitors. *Rev Urol*. 6 (3), 121-127.
- Romero JC, Hernández A, Licea ME, Márquez A. (1997). Evaluación electrofisiológica, vascular y hormonal en diabéticos tipo 1 con disfunción sexual eréctil. *Rev Asoc Latioam*, 3, 147-153.
- Rosen MP, Greenfield AJ, Walker TG, y col., (1990). Arteriogenic impotence: findings in 195 impotent men examined with selective internal pudendal angiography. Young Investigator's Award. *Radiology*, 174, 1043.).
- Rosen RC, Riley A, Wagner G, Osterloh IH, Kirkpatrick J, Mishra A. (1997). The international index of erectile function (IIEF): a multidimensional scale for assessment of erectile dysfunction. *Urology*, 49 (6), 822-830.
- Rosen RC, Giuliano F, Carson CC. (2005). Sexual dysfunction and lower urinary tract symptoms (LUTS) associated with benign prostatic hyperplasia (BPH). *Eur urol*, 47, 824-837.
- Rosen RC. (2006). Update on the relationship between sexual dysfunction and lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia. *Curr Opin Urol*, 16, 11-19.
- Rosolowsky M, Campbell WB. (1993). Role of PGI_2 and epoxyeicosatrienoic acids in relaxation of bovine coronary arteries to arachidonic acid. *Am J Physiol*, 264, H327-H335.
- Roumeguere T, Wespes E, Carpentier Y, Hoffmann P, Schulman CC. (2003). Erectile dysfunction is associated with a high prevalence of hyperlipidemia and coronary heart disease risk. *Eur Urol* 44, 355–359.
- Rufino AT, Rosa SC, Judas F, Mobasher A, Lopes MC, Mendes AF. (2013). Expression and function of (KATP) channels in normal and osteoarthritic human chondrocytes: possible role in glucose sensing. *J Cell Biochem*, 14 (8), 1879-1889.
- Ruiz Rubio JL, Hernández M, Rivera de los Arcos L, Benedito S, Recio P, García P, García-Sacristán A, Prieto D. (2004). Role of ATP-sensitive K^{+} channels in relaxation of penile resistance arteries. *Urology*, 63, 800-805.
- Russo D, Musone D, Alteri V, Cindolo L, Lanzillo B, Federico S, Andreucci VE. (2005). Erectile dysfunction in kidney transplanted patients: efficacy of sildenafil. *J Sex Med*, 2 (1), 26-39.
- Sacco E, Bientinesi R. Mirabegron: a review of recent data and its prospects in the management of overactive bladder. *Ther Adv Urol*. 2012; 4(6), 315–324
- Saenz de Tejada I, Goldstein I. (1988). Diabetic penile neuropathy. *Urol Clin North Am*. 15 (1): 17-22. .
- Saenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzi K, Krane RJ, Cohen RA. (1989). Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *New Engl J Med*, 320: 1025-1030.
- Saenz de Tejada I, Moroukian P, Tessier J, Kim JJ, Goldstein I, Frohrib D. (1991). Trabecular smooth muscle modulates the capacitor function of the penis. Studies on a rabbit model. *Am J Physiol*, 260 (5 pt 2), H1590-H1595

Bibliografía

- Saenz de Tejada I, Anglin G, Knight JR, Emmick JT. (2002). Effects of tadalafil on erectile dysfunction in men with diabetes. *Diabetes Care*, 25, 2159-2164.
- Saenz de Tejada I, Angulo J, Celtek S, González-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, Simonsen U. (2004). Physiology of erectile function. *J Sex Med*, 1 (3), 254-265.
- Sáenz de Tejada I, Angulo J, Celtek S, González-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, Simonsen U. (2005). Pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med*, 2 (1), 26-39.
- Sanchez M, McManus OB. (1996). Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology*, 35, 963-968.
- Sand A, Andersson E, Fried G. (2006). Nitric oxide donors mediate vasodilation in human placental arteries partly through a direct effect on potassium channels. *Placenta*, 27(2-3), 181-190.
- Sánchez A, Villalba N, Martínez AC, García-Sacristán A, Hernández M, Prieto D (2008). Mechanisms of the relaxant effect of vardenafil in rat penile arteries. *Eur J Pharmacol* 586, 283–287.
- Sasaki K, Yoshimura N, Chancellor MB. (2003). Implications of diabetes mellitus in urology. *Urol Clin North Am*, 30, 1-12.
- Sattar AA, Haot J, Schulman CC, y col., (1996). Comparison of anti-desmin and anti-actin staining for the computerized analysis of cavernous smooth muscle density. *Br J Urol* 1996;77:266).
- Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P, Hofmann F. (2000). Mechanism of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*, 87(9), 825-830.
- Sawada K, Morishige K, Hashimoto K, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y, Kurachi Y. (2005). Gestational change of K1 channel opener effect is correlated with the expression of uterine KATP channel subunits. *Eur. J. Obstet. Gynecol Reprod Biol*, 122, 49–5.
- Schiavi RC, Stimmel BB, Mandeli J, Rayfield EJ. (1993). Diabetes mellitus and male sexual function: a controlled study. *Diabetologia*, 36 (8):745-751
- Schmidt M, Voss M, Weernink PA, Wetzel J, Amano M, Kaibuchi K, Jakobs KH. (1999). A role for rho-kinase in rho-controlled phospholipase D stimulation by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem*, 274(21):14648-14654.
- Schneider T, Fetscher C, Krege S, Michel MC. (2004). Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther*, 309, 1148-1153.
- Schubert R, Nelson MT. (2001). Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci*, 22 (10), 505-512.
- Schumacher MA, Rivard AF, Bachinger HP, and Adelman JP. (2001) Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature*, 410, 1120-1124.
- Schumacher MA, Crum M, and Miller MC. (2004). Crystal structures of apocalmodulin and an apocalmodulin/SK potassium channel gating domain complex. *Structure*, 12, 849-860.
- Seeger TF, Bartlett B, Coskran TM, Culp JS, James LC, Krull DL, Lanfear J, Ryan AM, Schmidt CJ, Strick CA, Varghese AH, Williams RD, Wylie PG, Menniti FS. (2003). Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Res*, 985, 113–126.

Bibliografía

Seftel AD, Viola KA, Kasner SE, Ganz MB. (1996). Nitric oxide relaxes rabbit corpus cavernosum smooth muscle via a potassium-conductive pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 219 (2), 382-387.

Seftel AD, Vaziri ND, Ni Z, Razmjouei K, Fogarty J, Hampel N, Polak J, Wang RZ, Ferguson K, Block C, Haas C.(1997). Advanced glycation end products in human penis: elevation in diabetic tissue, site of deposition, and possible effect through iNOS or eNOS. *Urology*, 50 (6), 1016-1026

Seftel A, Sun P, Swindle R. (2004).The prevalence of hypertension: hyperlipidemia diabetes mellitus and depression in men with erectile dysfunction. *J Urol*, 171:2341-2345.

Selvin E, Burnett AL, Platz EA. (2007). Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in the US. *Am J Med*, 120 (2):151-157.

Shabsigh R, Fishman IJ, Schum C, y col., (1991). Cigarette smoking and other vascular risk factors in vasculogenic impotence. *Urology*, 38, 227.

Shah M, Haylett DG. (2000). The pharmacology of hSK1 Ca^{2+} -activated K^{+} channels expressed in mammalian cell lines. *Br J Pharmacol*, 129(4), 627–630.

Sheldon JH, Norton NW, Argentieri TM. (1997). Inhibition of guinea pig detrusor contraction by NS-1619 is associated with activation of BKCa and inhibition of calcium currents. *J Pharmacol Exp Ther*. 283 (3), 1193-200.

Shieh RC, John SA, LeeJK, Weiss JN. (1996). Inward rectification of the IRK1 channel expressed in *Xenopus* oocytes: effects of intracellular pH reveal an intrinsic gating mechanism. *J Physiol*, 494 (Pt2), 363-376.

Shieh C, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. (2000). Potassium channels: Molecular Defects, Diseases and Therapeutic Opportunities. *Pharmacol Rev*. 52: 557-593.

Shiri R, Koskimäki J, Hakama M, Häkkinen J, Huhtala H, Tammela TL, Auvinen A.(2004). Effect of life-style factors on incidence of erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 16 (5), 389-394.

Shukla N, Hotston M, Persad R, Angelini GD, Jeremy JY.(2009). The administration of folic acid improves erectile function and reduces intracavernosal oxidative stress in the diabetic rabbit. *BJU Int*, 103, 98-103.

Sim JH, Yang DK, Kim YC, Park SJ, Kang TM, So I, Kim K W. (2002). ATP-sensitive $\text{K}(1)$ channels composed of Kir6.1 and SUR2B subunits in guinea pig gastric myocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282, G137–G144.

Simonsen U, Prieto D, Sáñez de Tejada I, García-Sacristán A. (1995). Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive $\text{K}(+)$ -channels. *Br J Pharmacol*, 116(6): 2582–2590.

Simonsen U, Prieto D, Delgado JA, Hernandez M, Resel L, Saenz de Tejada I, Garcia-Sacristan A. (1997). Nitric oxide is involved in the inhibitory neurotransmission and endothelium-dependent relaxations of human small penile arteries. *Clin Sci (Lond)*, 92, 269-75.

Simonsen U, García Sacristán A, Prieto D. (2002). Penile Arteries and Erection. *J Vas Res*, 39, 283-303.

Simopoulos DN, Gibbons SJ, Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G, Ritman EL y col.,(2001). Corporeal structural and vascular micro architecture with X-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: histopathological correlation. *J Urol*, 165, 1776-1782.

Singh S, Syme CA, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ. (2001). Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 296 (2), 600-611.

Bibliografía

- Siuciak JA, Chapin DS, Harms JF, Lebel LA, McCarthy SA, Chambers L, Shrikhande A, Wong S, Menniti FS, Schmidt CJ. (2006). Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology*, 51, 386–396.
- Skakkebaek NE, Bancroft J, Davidson DW, Warner P. (1981). Androgen replacement with oral testosterone undecanoate in hypogonadal men: a double blind controlled study. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 14 (1):49-61.
- Soder RP, Petkov GV (2011). Large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel activation with NS1619 decreases myogenic and neurogenic contraction of rat detrusor smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, 670, 252–259.
- Soder RP, Parajuli SP, Hristov KL, Rovner, ES, Petkov, GV. (2013). SK channel- selective opening by SKA-3 induces hyperpolarization and decreases contractility in human urinary bladders smooth muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 304, R155–R163.
- Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. (1998). Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem*, 273(25), 15553-15558.
- Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA (1999). Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 7071–7076.
- Sogaard R, Ljungstrom T, Pedersen KA, Olensen SP, and Jensen BS. (2001). KCNQ4 channels expressed in mammalian cells: functional characteristics and pharmacology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C859-C866.
- Somlyo AV, Khromov AS, Webb MR, Ferenczi MA, Trentham DR, He ZH, Sheng S, Shao Z, Somlyo AP. (2004). Smooth muscle myosin: regulation and properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359b (1452), 1921-1930.
- Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. (2001). Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension*, 37 (4), 1053-1059. *Hypertension* 2001 May;37(5):1350.
- Sparwasser C, Drescher P, Will JA, Madsen PO. (1994). Smooth muscle tone regulation in rabbit cavernosal and spongiosal tissue by cyclic AMP and cyclic GMP-dependent mechanisms. *J Urol*, 152, 2159-2163.
- Spektor M, Rodríguez R, Rosenbaum RS, Wang H-Z, Melman A, Christ GJ. (2002). Potassium channels and human corporeal smooth muscle cell tone: further evidence of the physiological relevance of the maxi-K channel subtype to the regulation of human corporeal smooth muscle tone in vitro. *J Urol*, 167, 2628-2635.
- Spruce AE, Standen NB, Stanfield, PR. (1985). Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature*, 316, 736–738.
- Stanarius A, Uckert S, Machtens SA, Stief CG, Wolf G, Jonas U. (2001). Immunocytochemical distribution of nitric oxide synthase in the human corpus cavernosum: an electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Urol Res*, 29, 168-172.
- Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. (1989a). Hyperpolarizing Vasodilators activate ATP-Sensitive K^{+} -Channels In Atrial Smooth Muscle. *Science*, 245, 177–180.
- Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, Abrams P, Herzog AR, Corey R, Y Col., (2003). Prevalence And Burden Of Overactive Bladder In The United States. *World J Urol*; 20:327-336
- Stocker R, Keaney JF Jr. (2004). The Role Of Oxidative Modifications In Atherosclerosis. *Physiol Re*, 84:1381–1478.
- Strobaek D, Christophersen P, Holm NR, Moldt P, Ahring PK, Johansen TE, Olensen SP. (1996). Modulation Of Ca^{2+} -Dependent K^{+} Channel, Also, By The Substituted Diphenilurea NS1608, Paxilline And Internal Ca^{2+} . *Neuropharmacology*, 35, 903-914.

Strobaek D, Jorgensen TD, Christophersen P, Ahring PK, And Olesen SP. (2000). Pharmacological Characterization Of Small-Conductance Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels Stably Expressed In HEK 293 Cells. *Br J Pharmacol* 129: 991-999.

Strobaek D, Teuber L, Jorgensen TD, Ahring PK, Kaer K, Hansen RS, Olesen SP, Christophersen P and Skaaning-Jensen B. (2004). Activation of human IK and SK Ca^{2+} -activated K^{+} channel by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione-3 oxime). *Biochem Biophys Acta*, 1665, 1-5.

Shukla N, Jones R, Persad R, Angelini GD, Jeremy JY. (2005). Effect of sildenafil citrate and a nitric oxide donating sildenafil derivative, NCX 911, on cavernosal relaxation and superoxide formation in hypercholesterolaemic rabbits. *Eur J Pharmacol*, 517 (3), 224-231.

Sullivan ME, Dashwood MR, Thompson CS, Muddle JR, Mikhailidis DP, Morgan RJ. (1992). Alterations in endothelin B receptor sites in cavernosal tissue of diabetic rabbits: potential relevance to the pathogenesis of erectile dysfunction. *J Urol*, 158, 1966-1972.

Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, y col., (1999). Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? *Cardiovasc Res* 43: 658-665.

Syme CA, Gerlach AC, Singh AK, and Devor DC. (2000). Pharmacological activation of cloned intermediate and small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278, C570-C581.

Taher A, Meyer M, Stief CG, Jonas U, Forssmann WG (1997). Cyclic nucleotide phosphodiesterase in human cavernous smooth muscle. *World J Urol* 15: 32–35.

Takasu T, Ukai M, Sato S, y col., (2007). Effect of (R)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-4'-{2-[(2-hydroxy-2-phenylethyl)amino]ethyl} acetanilide (YM178), a novel selective β_3 -adrenoceptor agonist, on bladder function. *J Pharmacol Exp Ther*, 321(2), 642–647.

Tamaoki J, Isono K, Kondo M, Yamawaki I, Tagaya E, Nagai A. (1998). A human bronchial epithelial cell line releases arginine vasopressin: involvement of Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Regul Pept*, 74 (2-3), 91-95.

Tanaka Y, Meera P, Song M, Knaus Hg, and Toro L. (1997). Molecular constituents of maxi Kca channels in human coronary smooth muscle: predominant $\alpha + \beta$ subunit complexes. *J Physiol*, 502, 545-557.

Tanaka M, Sasaki Y, Kimura Y, Fukui T, Hamada K, Ukai Y (2003). A novel pyrrole derivative, NS-8, supresses the rat micturition réflex by inhibiting afferent pelvic nerve activity. *BJU Int*.92, 1031-1036.

Tanaka Y, Koike K, Toro L (2004). MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J Smooth Muscle Res*, 40, 125–153.

Tang XD, Xu R, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T. (2003). Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature*, 425, 531-535.

Tang KD, Garcia MI, Heinemann SH, Hoshi T. (2004). Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing. *Nat Struct Mol Biol* 11, 171-178.

Tarhan F, Kuyumcuoglu U, Kolsuz A, Ozgül A, Cangüven O. (1997). Cavernous oxygen tension in the patients with erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 9, 149-153.

Taylor MS, Bonev AD, Gross TP, Eckman DM, Brayden JE, Bond CT, Adelman JP, and Nelson MT. (2003). Altered expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ Res*, 93:124–131.

Bibliografia

- Teramoto N, McMurray G, Brading AF (1997). Effects of levcromakalim and nucleoside diphosphates on glibenclamide-sensitive K1 channels in pig urethral myocytes. *Br J Pharmacol*, 120, 1229–1240.
- Teramoto N, Yunoki T, Tanaka K, Takano M, Masaki I, Yonemitsu Y, Sueishi K, Ito Y. (2000). The effects of caffeine on ATP-sensitive K (1) channels in smooth muscle cells from pig urethra. *Br J Pharmacol*, 131, 505–513.
- Teramoto, N. (2006) Physiological roles of ATP-sensitive K1 channels in smooth muscle. *J. Physiol*, 572, 617–624.
- Tesfamariam B, Cohen RA.(1992). Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol*, 263, H321–H326.
- Thébaud B, Michelakis E, Wu XC, Harry G, Hashimoto K, Archer SL.(2002). Sildenafil reverses O2 constriction of the rabbit ductus arteriosus by inhibiting type 5 phosphodiesterase and activating BK(Ca) channels. *Pediatr Res*, 52(1), 19-24.
- Tomar R, Dhindsa S, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R, Dandona P.(2006). Contrasting testosterone concentrations in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29, 1120-1122.
- Tomasian D, Keaney JF Jr, Vita JA. (2000). Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res*, 47, 426–435.
- Tong X, Evangelista A, Cohen RA. (2010). Targeting the redox regulation of SERCA in vascular physiology and disease. *Curr Opin Pharmacol*, 10 (2), 133-138.
- Toro L, Wallner M, Meera P, Tanaka Y. (1988). Maxi-Kca, a unique member of the voltage-gate K channel superfamily. *News Physiol Sci* 13, 112-117.
- Traish AM, Guay A, Feeley R, Saad F. (2009). The dark side of testosterone deficiency: I. Metabolic syndrome and erectile dysfunction. *J Androl*, 30(1), 10-22.
- Trigo-Rocha F, Aronson WJ, Hohenfellner M, Ignarro LJ, Rajfer J, Lue TF. (1993). Nitric oxide and cGMP: mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs. *Am J Physiol*, 264, H419-H422.
- Tripathy D, Aljada A, Dandona P.(2003). Free fatty acids (FFA) and endothelial dysfunction: role of increased oxidative stress and inflammation. *Diabetologia*, 46, 300–301.
- Trivedi S, Potter-Lee L, Li JH, Yasay GD, Russell K, Ohnmacht CJ, Empfield JR, Trainor DA, Kau ST.(1995). Calcium dependent K-channels in guinea pig and human urinary bladder. *Biochem Biophys Res Commun*, 213 (2), 404-409.
- Trube G, Hescheler J. (1984). Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 401, 178–184.
- Trussell JC, Legro RS. (2007). Erectile dysfunction: does insulin resistance play a part? *Fertil Steril*, 88, 771–778.
- Uchida H, Shishido K, Nomiya M, Yamaguchi O. (2005). Involvement of cyclic AMP- dependent and independent mechanisms in the relaxation of rat detrusor muscle via beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, 518, 195-202.
- Uckert S, Hedlund P, Waldkirch E, Sohn M, Jonas U, Andersson KE, Stief CG. (2004). Interactions between cGMP- and cAMP-pathways are involved in the regulation of penile smooth muscle tone. *World J Urol*, 22 (4), 261-266.

Bibliografia

- Uebele VN, Lagrutta A, Wade T, Figuero DJ, Liu Y, McKenna E, Austin CP, Bennet PB, Swanson R. (2000). Cloning and functional expression of two families of β -subunits of the large conductance calcium-activated K⁺ channel. *J Biol Chem*, 275, 23211-23218.
- Ungvari Z, Csiszar A, Koller A. Increases in endothelial Ca²⁺ activate K_{Ca} channels and elicit EDHF-type arteriolar dilation via gap junctions. (2002). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282, H1760-H1767.
- Usta MF, Bivalacqua TJ, Yang DY, Ramanitharan A, Sell DR, Viswanathan A y col., (2003). The protective effect of aminoguanidine on erectile function in streptozotocin diabetic rats. *J Urol*, 170, 1437-42.
- Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R. (1999). Acute activation of Maxi_K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285, 1929-1931.
- Vande Griend JP, Linnebur SA. (2012). Inhaled anticholinergic agents and acute urinary retention in men with lower urinary tract symptoms or benign prostatic hyperplasia. *Ann.Pharmacother*.46, 1245–1249.
- Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R. (2002). Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension*, 39 (1), 135-141.
- Venkateswarlu K, Giraldi A, Zhao W, Wang H-Z, Melman A, Spektor M, Christ GJ. (2002). Potassium channels and human corporeal smooth muscle cell tone: Diabetes and relaxation of human corpus cavernosum smooth muscle by adenosine triphosphate sensitive potassium channel openers. *J Urol*, 168, 355-361.
- Vernet D, Cai L, Garban H, Babbitt ML, Murray FT, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. (1995). Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type I) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. *Endocrinology*, 136, 5709-5717.
- Vickers MA, Satyanarayana R (2002). Phosphodiesterase type 5 inhibitors for the treatment of erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Int J Impot Res*, 14, 466–471.
- Vij M, Drake JM. (2015). Clinical use of the β_3 adrenoceptor agonist mirabegron in patients with overactive bladder syndrome. *Ther Adv Urol*, 7 (5), 241-248.
- Vikram, A., Jena, G.B., Ramarao, P. (2010). Increased cell proliferation and contractility of prostate in insulin resistant rats: linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia. *Prostate*, 70, 79-89.
- Villar IC, Panayiotou CM, Sheraz A, Madhani M, Scotland RS, Nobles M, Kemp-Harper B, Ahluwalia A, Hobbs AJ. (2007). Definitive role for natriuretic peptide receptor-C in mediating the vasorelaxant activity of C-type natriuretic peptide and endothelium-derived hyperpolarising factor. *Cardiovasc Res*, 74 (3), 515-525.
- Virag R, Bouilly P, Frydman D. (1985). Is impotence an arterial disorder? A study of arterial risk factors in 440 impotent men. *Lancet*, 1, 181-184.
- Vick RN, Benevides M, Patel M, Parivar K, Linnet O, Carson CC (2002). The efficacy, safety and tolerability of intracavernous PNU-83757 for the treatment of erectile dysfunction. *J Urol*, 167, 2618-2623.
- Wagg A. (2012). The cognitive burden of anticholinergics in the elderly – implications for the treatment of overactive bladder. *Eur Urol Rev*, 7 (1), 42–49.
- Waldkirch ES, Uckert S, Langnäse K, Richter K, Jonas U, Wolf G, Andersson KE, Stief CG, Hedlund P. (2007). Immunohistochemical distribution of cyclic GMP-dependent protein kinase-1 in human prostate tissue. *Eur Urol*, 52 (2), 495-501.
- Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P. (1999). Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol*, 83, 3C-12C.

Bibliografia

- Walters FS, Covarrubias M, Ellingson JS. (2000). Potent inhibition of the aortic smooth muscle maxi-K channel by clinical doses of ethanol. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C1107-C1115.
- Walsh MP, Andrea JE, Allen BG, Clément-Chomienne O, Collins EM, Morgan KG. (1994). Smooth muscle protein kinase C. *Can J Physiol Pharmacol*, 72 (11), 1392-1399.
- Wang W, Giebisch G. (1991). Dual modulation of renal ATP-sensitiveK_p-channel by protein kinaseA and C. *ProcNatl Acad Sci USA*, 88, 9722–9725.
- Wang XL, Ye D, Peterson TE, Cao S, Shah VH, Katusic ZS et al. (2005). Caveolae targeting and regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 280, 11656–11664.
- Warth R, Hamm K, Bleich M, Kunzelmann K, von Hahn T, Schreiber R, Ullrich E, Mengel M, Trautmann N, Kindel P, Schwab A, Greger R. (1999). Molecular and functional characterization of the small Ca (2+)-regulated K⁺ channel (rSK4) of colonic cryp. *Pflugers Arch*, 438 (4), 437-44.
- Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL.(2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280, E685-E694.
- Werner ME, Zvara P, Meredidith AL, Aldrich RW, Nelson MT. (2005). Erectile dysfunction in mice lacking the large–conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *J Physiol*, 567, 545-566.
- Werner ME, Knorn AM, Meredith AL, Aldrich RW, Nelson MT. (2007). Frequency encoding of cholinergic- and purinergic-mediated signaling to mouse urinary bladder smooth muscle: modulation by BK channels. *AM J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292, R616-R624.
- Westfall DP, Fedan JS, Colby J, Hogaboom GK, O'Donnell JP. (1983). Evidence for a contribution by purines to the neurogenic response of the guinea-pig urinary bladder. *Eur J Pharmacol*, 87, 415-422.
- Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble JP, Westfall TD. (2003). Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle.*Br J Pharmacol*, 138 (5):, 757–766.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Dibetes Care*, 27 (5), 1047-1053.
- Wingard C, Fulton D, Husain S. (2007). Altered penile vascular reactivity and erection in the Zucker obese-diabetic rat. *J Sex Med*, 4, 348-362.
- Wuest M, Eichhorn B, Grimm MO, Wirth MP, Ravens U, Kaumann AJ.(2009). Catecholamines relax detrusor through beta 2-adrenoceptors in mouse and beta 3-adrenoceptors in man. *J Pharmacol Exp Ther*, 328 (1), 213-222.
- Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, and Chandy KG. (2000). Desing of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosupressant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, n8151-n8156.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Waymen A, Johnsonm-Pais T, Keen JE, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395, 503-507
- Xia XM, Ding JP, Lingle CJ. (1999). Molecular basis for the inactivation of Ca²⁺- and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *J Neurosci*, 19, 5255-5264.

Bibliografia

- Xia XM, Ding JP, Zeng XH, Duan KL, Lingle CJ. (2000). Rectification and rapid activation at low Ca^{2+} of Ca^{2+} -activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel β subunit. *J Neurosci* 20, 4890-4903.
- Xu B, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A, Ruggerio D. (2003). Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J*, 17, 1289-1291
- Yamaguchi O. (2010). Beta3-adrenoceptors in human detrusor muscle. *Urology* 2002, 59 (Suppl1), 25-29.
- Yamaguchi O. (2009). Antimuscarinics and overactive bladder: other mechanism of action. *Neurourol Urodyn*, 29 (1), 112-115.
- Yamamura H, Ohi Y, Muraki K, Watanabe M, Imaizumi Y. (2001). BK channel activation by NS-1619 is partially mediated by intracellular Ca^{2+} release in smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Br J Pharmacol*. 132 (4) 828-834.
- Yassin A, Saad F, Hoesl CE, Traish AM, Hammadeh M, Shabsigh R. (2006). Alpha-adrenoceptors are a common denominator in the pathophysiology of erectile function and BPH/LUTS--implications for clinical practice. *Andrologia*, 38 (1), 1-12.
- Yoshimura N, Chancellor MB. (2002). Current and future pharmacological treatment for overactive bladder. *J Urol* 168 (5), 1897-1913.
- Yuasa K, Kotera J, Fujishige K, Michibata H, Sasaki T, Omori K. (2000). Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression. *J Biol Chem*, 275, 31469-31479.
- Yuasa K, Ohgaru T, Asahina M, Omori K. (2001). Identification of rat cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A (PDE11A): comparison of rat and human PDE11A splicing variants. *Eur J Biochem*, 268, 4440-4448.
- Yunoki T, Teramoto N, Ito Y. (2003). Functional involvement of sulphonylurea receptor (SUR) type 1 and 2B in the activity of pig urethral ATP-sensitive K^+ channels. *Br J Pharmacol*, 139, 652-660.
- Zaccolo M. (2009). cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. *Br J Pharmacol*, 158 (1), 50-60.
- Zderic SA, Rohrmann D, Gong C, Snyder HM, Duckett JW, Wein AJ, Levin RM. (1996). The decompensated detrusor II: evidence for loss of sarcoplasmic reticulum function after bladder outlet obstruction in the rabbit. *J Urol*, 156(2 Pt 2):587-592.
- Zhang XH, Filippi S, Morelli A, Vignozzi L, Luconi M, Donati S y col., (2006). Testosterone restores diabetes-induced erectile dysfunction and sildenafil responsiveness in two distinct animal models of chemical diabetes. *J Sex Med*, 3, 253-264.
- Zhou X-B, Arntz C, Kamm S, Motejlek K, Sausbier U, Wang G-X y col., (2001). A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem* 276: 43239-43245.
- Zografos P, Li JH, Kau ST. (1992). Comparison of the in vitro effects of K^+ channel modulators on detrusor and portal vein strips from guinea pigs. *Pharmacol*. 45, 216-230.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. (2002). Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*, 109, 817-826.